

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>A61K 9/16, 9/51</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 97/34584</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 25 septembre 1997 (25.09.97)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/00471 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 14 mars 1997 (14.03.97) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/03546 15 mars 1996 (15.03.96) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> FLAMEL TECHNOLOGIES [FR/FR]; Parc-Club du Moulin à Vent, 33, avenue du Docteur-Georges-Lévy, F-69693 Vénissieux Cédex (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> LEMERCIER, Alain [FR/FR]; 3, rue Hector-Berlioz, F-69720 Saint-Bonnet-de-Mûre (FR). MEYRUEIX, Rémi [FR/FR]; 42-43, rue Hector-Berlioz, Le Bois Saint-Rambert, F-69009 Lyon (FR). HUILLE, Sylvain [FR/FR]; 10, rue Maryse-Bastie, F-69008 Lyon (FR). SOULA, Gérard [FR/FR]; 33, rue de Nungesser, F-69330 Meyzieu (FR). <b>(74) Mandataire:</b> ROPITAL-BONVARLET, Claude; Cabinet Beau de Loménie, 51, avenue Jean-Jaurès, Boite postale 7073, F-69301 Lyon Cédex 07 (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Titre:</b> COMPOSITE GEL MICROPARTICLES AS ACTIVE PRINCIPLE CARRIERS		
<b>(54) Titre:</b> MICROPARTICULES DE GEL COMPOSITE COMME VECTEURS DE PRINCIPES ACTIFS		
<b>(57) Abstract</b>		
<p>Carriers for delivering medicinal, nutritional, plant-protecting or cosmetic active principles are disclosed. One of the essential aims is to provide biocompatible, biodegradable, non-immunogenic, stable, solvent-free active principle delivery particles with a controllably and adjustably small particle size for protecting the active principles without denaturing same as well as releasing said active principles. Therefore, microparticles with a cohesive structure made of a composite, physically and chemically stable and integral gel are provided which include an oil (I), e.g. coconut oil, an aqueous phase (II) and a non-cross-linked linear copolyaminoacid such as (statistical or diblock) Leu/Glu. The size of said delivery particles is controllable and adjustable between 0.05 and 500 <math>\mu</math>. Said carriers are useful for delivering drugs, nutrients and plant-protecting or cosmetic substances.</p>		
<b>(57) Abrégé</b>		
<p>La présente invention concerne des vecteurs de transport de Principes Actifs (PA) médicamenteux, nutritionnels, phytosanitaires ou cosmétiques. L'un des objectifs essentiels de l'invention est de fournir des particules de vectorisation (PV) de PA de faible granulométrie contrôlable et ajustable, protectrices du PA, biocompatibles, biodégradables, non-immunogènes, stables, exemptes de solvant, non dénaturantes pour le PA et permettant la libération de ce dernier. Cet objectif est atteint grâce à l'invention qui concerne des microparticules de structure cohésive faites de gel composite, physico-chimiquement stable et intègre et comprenant de l'huile (I) - e.g. huile de coco -, une phase aqueuse (II) et un copolyaminoacide linéaire non réticulé de type Leu/Glu (statistique ou dibloc). Ces PV ont une taille contrôlable et ajustable entre 0,05 et 500 <math>\mu</math>. Application: vectorisation de médicaments, de nutriments et de produits phytosanitaires ou cosmétiques.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## MICROPARTICULES DE GEL COMPOSITE COMME VECTEURS DE PRINCIPES ACTIFS

5    **DOMAINE TECHNIQUE :**

Le domaine de la présente invention est celui des vecteurs utiles pour l'administration de principes actifs (PA), de préférence médicamenteux ou nutritionnels, notamment par voie orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale, parentérale, etc. Ces vecteurs permettent le transport sous protection des PA, à l'intérieur de l'organisme, jusqu'à leur site d'action. Ils visent à améliorer la biodisponibilité des PA. Ces vecteurs peuvent être, e. g., des systèmes à libération prolongée de PA.

15    Les PA plus particulièrement, mais non limitativement, concernés par l'invention sont, par exemple, des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, des oligonucléotides et des polynucléotides.

La présente invention concerne, plus précisément, des particules - avantageusement de type submicroniques et/ou microniques - de Vectorisation (PV), de PA, en particulier médicamenteux.

20    Outre les PA médicamenteux et nutritionnels, l'invention concerne, également, des PA phytosanitaires ou cosmétiques.

La présente invention vise aussi bien les particules nues en tant que telles, que les systèmes de vecteurs de PA, constitués par les particules chargées par le (ou les) PA considéré(s).

25    L'invention concerne, également, un procédé de préparation desdites particules.

**ART ANTERIEUR :**

30

Les progrès du génie génétique et des biotechnologies, ainsi que les découvertes y afférentes d'outils génétiques, de protéines et de peptides biologiquement actifs, ont permis l'essor de nouveaux principes actifs médicamenteux (PA) offrant une activité intrinsèque et une sélectivité élevées. Ces PA sont, en revanche, facilement dégradés dans l'organisme avant d'atteindre leur site d'action thérapeutique et leur biodisponibilité est, en conséquence, très faible. Dans le cas de

35

l'administration par la voie orale, le tractus gastro-intestinal constitue une barrière chimique et physique redoutable pour le **PA** qui doit, d'une part, résister à la dégradation par le système digestif et, d'autre part, passer à travers la membrane épithéliale gastro-intestinale. A cet égard, on pourra, par exemple, se reporter à la

5 revue de M. J. HUMPHREY (Delivery System for peptide Drugs, éditée par S. DAVIS et L. ILLUM, Plenum Press, N. Y., 1986), qui fait état de la faible biodisponibilité des peptides et des peptides administrés par voie orale.

Naturellement, ces avatars de transport et de séjour dans l'organisme ne se limitent pas aux protéines, mais affectent également les **PA** formés par des outils

10 génétiques (oligonucléotides, polynucléotides, plasmides) susceptibles d'être mis en oeuvre dans les techniques de thérapie génique.

Pour pallier cela, il a été proposé d'encapsuler les **PA** dans des particules de vectorisation de **PA**, dénommées également **PV**. L'intérêt de ces techniques d'encapsulation est de protéger et/ou de transporter le **PA** jusqu'à son site d'action

15 thérapeutique, en le sauvegardant contre les agressions de l'organisme, afin d'augmenter sa biodisponibilité.

Parmi tous les matériaux envisageables pour l'encapsulation de **PA**, les polymères sont de plus en plus utilisés, du fait de leurs propriétés intrinsèques.

S'agissant du cahier des charges que l'on souhaite obtenir pour de telles

20 **PV**, il est particulièrement exigeant et comprend, notamment, les spécifications suivantes.

1 - Il devrait, avantageusement, être possible de pouvoir disposer de **PV** de diamètre moyen compris entre une fraction de micron et quelques microns, avec une répartition granulométrique étroite, de façon à pouvoir adapter la

25 granulométrie des **PV** au mode d'administration choisi et/ou le site thérapeutique visé. Par exemple, si une immunisation mucosale par la voie orale est recherchée, la taille des **PV** doit être comprise entre 0,5  $\mu\text{m}$  et 10  $\mu\text{m}$ , afin que les **PV** puissent pénétrer les plaques de Peyer et atteindre les tissus lymphoïdes. Dans le cas d'une administration sous-cutanée, il y a avantage à

30 disposer de **PV** de taille supérieure à 10  $\mu\text{m}$  pour que les particules ne rentrent pas dans la circulation générale où elles sont rapidement internalisées par le système réticulo-endothélial, mais qu'elles diffusent progressivement depuis leur site d'injection.

Cette spécification implique un contrôle dimensionnel des **PV**, à la fois sur la

35 distribution de la granulométrie des **PV** et sur leur diamètre moyen, qui représente une opération très délicate sur le plan technologique.

- 2 - Il est souhaitable que les PV assurent la protection du PA jusqu'au site de libération. Par exemple, dans une administration orale d'un PA formé par un vaccin, ce dernier gagnerait à être protégé, tout au long du tractus gastrointestinal.
- 5 3 - Il est préférable que le polymère, constituant les PV, soit biocompatible et biodégradable et, encore mieux, qu'il soit métabolisé en produits non toxiques pour l'organisme.
- 4 - Il est également avantageux que le polymère, constitutif des PV, n'induisse pas de réponse immunitaire (immunogéniale).
- 10 5 - On attend des PV qu'elles permettent la libération contrôlée et prolongée du PA.
- 6 - Enfin, il est également préférable que les PV puissent être obtenues par un procédé non dénaturant pour le PA. Ainsi, l'usage de solvants organiques et/ou de températures élevées est à proscrire.

De nombreuses propositions techniques antérieures ont vainement tenté de satisfaire à l'ensemble de ces spécifications. Les réponses apportées jusqu'alors ne sont donc que partielles et incomplètes.

Dans toutes ces propositions infructueuses de l'art antérieur, plusieurs matériaux constitutifs de base ont été envisagés pour les particules de vectorisation PV. Ces matériaux peuvent être des polymères biocompatibles, tels que les protéines et/ou les polymères d' $\alpha$ -hydroxyacides (polylactiques et/ou glycoliques) et/ou des polycyanoacrylates d'alkyle et/ou des polyorthoesters et/ou des corps gras (huiles - graisses).

Les PV (microsphères ou microcapsules) de nature protéique sont, la plupart du temps, obtenues par des traitements drastiques de réticulation à l'aide d'agents chimiques du type glutaraldéhyde ou par élévation de la température. Il va sans dire que de tels traitements entraînent nécessairement une dénaturation de bon nombre de principes actifs. De surcroît, la toxicité des agents réticulants du type glutaraldéhyde est particulièrement mal venue dans les applications pharmaceutiques.

25 A titre d'exemples de telles microparticules connues, on peut citer celles divulguées dans la demande de brevet EP 0 363 921. Les particules selon cette demande sont obtenues par coacervation complexe d'un polyaminoacide synthétique et d'un polymère anionique, en solution aqueuse, par ajustement du pH. Le polyaminoacide est un copolymère amphiphile à base d'acide glutamique et de lysine, tandis que le polymère anionique est un polysaccharide soluble dans l'eau, tel que la gomme arabique.

30 On donne de la cohésion à ces particules par réticulation du coacervat à l'aide de glutaraldéhyde. Outre les problèmes de toxicité et de dégradation des PA

35

signalés ci-dessus, il convient d'observer que les polymères du coacervat selon l'EP 0 363 921 souffrent d'un caractère immunogène.

Des microparticules, protéiques ou à base de polymères biocompatibles et biodégradables, peuvent également être préparées par les techniques classiques d'émulsion.

A ce propos, on peut évoquer, par exemple, les demandes de brevets WO 91/06 286 et WO 91/06 287 qui décrivent des procédés de formation de particules en émulsion dans lesquels on utilise, comme polymère :

- soit une protéine hydrophobe choisie parmi le collagène, la caséine, la kératine et, de préférence, les prolamines,
- soit un polymère biocompatible et biodégradable, tel que les poly(lactiques) ou les poly(orthoesters).

Le PA peut être hydrophobe ou hydrophile mais, dans ce dernier cas, la technique de double émulsion est recommandée. La taille des microparticules est d'environ 100 µm et, de préférence, comprise entre 50 nm et 100 µm.

La demande de brevet WO 89/08 449 fait également référence à l'encapsulation par émulsion, pour incorporer des PA dans des microparticules de poly(lactiques) de taille inférieure à 10 µm. Et il est précisé, dans ce document, que cette taille est une limite maximale pour l'absorption au travers des tissus lymphoïdes des muqueuses (administrations orale, nasale, rectale, ophtalmologique).

Les techniques d'émulsion sont très séduisantes a priori, car elles permettent la mise en oeuvre de la plupart des PA dans des microparticules, dont on peut contrôler la granulométrie jusqu'à des tailles de l'ordre de 1 µm. Mais, dans ces techniques, on a recours à des solvants organiques pour solubiliser les polymères constitutifs des particules. Ces solvants sont, e. g. des cétones, des alcools, des amides ou leurs mélanges. Et malheureusement, il s'avère que ces solvants peuvent être dénaturants, notamment pour les PA peptidiques ou polypeptidiques.

On signalera, également, à la charge des polymères constitutifs du type poly- $\alpha$ -hydroxyacides (polylactique et/ou glycolique) un problème d'accumulation in vivo, de nature à engendrer des effets de rejet.

On connaît, également, des PV biocompatibles, formées en solution aqueuse sans élévation excessive de la température et appelées protéinoïdes. Ces PV ont été décrites dès 1970 par W. FOX et K. DOSE dans "Molecular Evolution and the origin of Life", Ed. Marcel DEKKER Inc. (1977).

En s'inspirant de ces travaux, la demande de brevet WO 88/01 213 propose un système à délivrance de PA à base de protéinoïdes. Le polymère utilisé est un mélange

de polypeptides artificiels obtenus par condensation thermique d'acides aminés synthétiques ou naturels et/ou de petites chaînes peptidiques. Le mode de condensation choisi conduit à des oligomères ramifiés et donc très peu solubles. Il est ensuite procédé à une sélection par filtration de ces oligomères ramifiés, afin de  
5 récupérer les fractions hydrosolubles. Cette fraction est nécessairement composée de réticulats ramifiés de très petite masse. Les microparticules selon cette invention sont obtenues par changement de pH qui crée la précipitation des oligomères ramifiés en protéinoïdes.

Lorsque la solution dans laquelle s'effectue la précipitation contient des PA en  
10 solution, une partie d'entre eux est entraînée dans le protéinoïde lors de sa formation.

Les inconvénients de ce système sont :

- un faible taux d'encapsulation,
- une méthode de synthèse par abaissement de pH,
- un procédé de purification des polymères délicat,
- 15 - un enchaînement non régulier (non alpha peptidique) des aminoacides dû au mode de synthèse qui ne permet pas d'affirmer que les réactions de dégradation enzymatiques seront identiques à celles d'un alpha-polyaminoacide,
- enfin, l'utilisation d'un grand nombre d'acides aminés monomères différents, qui peut induire une réponse immunitaire.

20 La demande de brevet WO 93/25 589 porte sur l'amélioration du procédé de synthèse de protéinoïdes par condensation thermique d'acides aminés. On retrouve les mêmes inconvénients que ceux attachés à l'objet de la demande mère évoquée ci-dessus.

Les microparticules, du type nanocapsules décrites dans la demande de  
25 brevet EP 0 608 207 et dont la paroi est à base de poly(2-cyanoacrylate d'alkyle), ne sont citées ici que pour mémoire, dans la mesure où la toxicité des résidus de monomères mis en oeuvre est clairement rédhibitoire pour les vectorisations de PA chez l'homme et/ou l'animal. Par ailleurs, on connaît mal l'élimination des résidus de tels polymères.

30 S'agissant maintenant des PV de nature essentiellement lipidique ou hydrophobe, on peut dénombrer plusieurs types de systèmes, à savoir :

- les liposomes,
- les particules lipidiques solides (SLP),
- les vésicules lipidiques à multiples chambres (VLMC),
- 35 - les particules de fondu super-refroidi (PSM),
- les émulsions lipidiques,

- et les particules du type porteur matriciel lipidique (LMC).

Les liposomes sont des structures colloïdales sphériques comprenant une phase interne aqueuse enveloppée par un ou plusieurs bi-couches de phospholipides. Les liposomes sont connus en tant que particules de vectorisation.

- 5 Un premier inconvénient des liposomes est leur instabilité dans les fluides biologiques et la vitesse élevée de relargage du PA qu'ils sont susceptibles de contenir. On se référera, à ce propos, à l'article de KIM et al., Biochim. Biophys. Acta, 728, 339-348, 1983.

- 10 Un deuxième inconvénient des liposomes est qu'ils ne permettent qu'un faible taux de chargement en PA.

Un troisième inconvénient des liposomes tient à leur instabilité au stockage.

Un quatrième inconvénient des liposomes est lié à la faible reproductibilité de leur fabrication et, notamment, à leur médiocre aptitude au piégeage de PA.

- 15 La littérature brevets sur les liposomes est dense. On citera, pour mémoire, les brevets suivants : US 3 993 754, US 4 235 871, US 4 356 167 et US 4 377 567.

- 20 La demande de brevet internationale PCT WO 94/20 072 décrit des particules lipidiques solides (SLP), de forme non sphérique et constituées par une matrice lipidique cristalline, solide à température ambiante. Les lipides à haut point de fusion concernés sont, de préférence, des triglycérides ( $\theta$  fusion = 30-120 °C). En suspension, ces SLP peuvent être stabilisées par des composés amphiphiles, ioniques ou non ioniques. Ces composés amphiphiles stabilisants peuvent être des phospholipides, des sphingolipides, des glycosphingolipides, des sels biliaires physiologiques, des acides gras saturés ou non, des alcools gras, des acides ou des alcools gras méthoxylés, de même que leurs esters et leurs éthers, des alcools
- 25 alkyloaryles polyéthers, des esters et des éthers de sucres ou de sucres-alcools avec des acides gras ou des alcools gras, des mono ou des di-glycérides acétylés ou éthoxylés, des copolymères blocs de polyoxyéthylène et de polyoxypropylène oxyde, des éthers ou des esters de sorbitan éthoxylé, des aminoacides, des polypeptides, des protéines (gélamines, albumines), ainsi que les mélanges des susdits composés.

- 30 Du fait de leur nature solide cristalline, ces SLP comportent, nécessairement, une étape de fusion à température élevée, lors de leur formage et de l'incorporation de PA. Il a déjà été signalé que les chauffages à températures élevées sont nuisibles à certains PA sensibles. En outre, compte tenu de la nature exclusivement lipidique des SLP, ces derniers s'avèrent non adaptés pour les PA hydrophiles. Enfin, lorsqu'il s'agit d'un PA
- 35 hydrophobe, de nature différente de celle formant la matrice du SLP, les rendements d'incorporation sont extrêmement faibles, de l'ordre de quelques %.



La demande de brevet internationale PCT WO 95/13 796 décrit des vésicules lipidiques à multiples chambres aqueuses internes (VLMC). Ces PV trouvent leur originalité par rapport aux liposomes, au travers de leur structure à multichambres non concentriques et à contenu aqueux. Lesdites chambres aqueuses  
5 sont formées chacune par une membrane formée d'un bicouche lipidique définissant une sphère.

Pour préparer ces VLMC, on met en oeuvre un lipide neutre, du type huile végétale, graisse animale ou tocophérol, ainsi qu'un lipide amphiphile doté d'une forte charge négative - e. g. phosphatidylsérine -. Ces deux types de lipides sont mis en solution  
10 dans un solvant organique auquel on ajoute une solution aqueuse comprenant le PA à encapsuler, de manière à former ainsi une émulsion eau dans huile. On complète cette émulsion par ajout d'un agent retardant la libération du PA. On procède ensuite à une deuxième émulsion par addition d'une solution aqueuse secondaire contenant au moins un agent osmotique non-ionique et un agent neutralisant les acides et ayant une  
15 faible force ionique. Après agitation, il se forme des sphérules de solvant contenant de multiples gouttelettes aqueuses. Par évaporation du solvant, on transforme ces sphérules en VLMC. Les chambres aqueuses internes sont donc en suspension dans la solution aqueuse secondaire et non dans le chloroforme qui a été éliminé.

Comme ses alter ego, cette technique de double émulsion est critiquable en ce qu'elle  
20 fait intervenir des solvants organiques toxiques, dont on ne peut garantir l'absence de traces dans les microparticules finales.

La demande de brevet internationale PCT WO 95/05 164 décrit des particules d'ubidecarenone ou d'autres substances faiblement solubles dans l'eau, dans lesquelles cette ou ces substances faiblement solubles dans l'eau, sont à l'état de  
25 "fondu super-refroidi", c'est-à-dire qu'elles se présentent dans un état assimilable à l'état liquide à une température inférieure à leur température de fusion. Ces particules, dénommées également PSM, requièrent la mise en oeuvre d'un stabilisant amphiphile (lécithine) lorsqu'elles sont mises en suspension dans un liquide aqueux. Ces stabilisants sont les mêmes que ceux décrits dans la demande PCT WO 94/20 072  
30 portant sur les SLP. Le fondu super-refroidi constituant la particule possède une température de fusion de l'ordre de 70 °C. Il s'agit donc de graisses et non pas d'huiles liquides à température ambiante. Les corps gras, susceptibles de former un tel fondu, sont choisis parmi les vitamines, les stérols ou les triglycérides, par exemple. Ces PSM sont obtenus par fusion de la substance destinée à former le fondu super-refroidi.  
35 Le composé amphiphile est alors dispersé dans cette substance fondue. On ajoute ensuite de l'eau et l'on soumet le mélange à une homogénéisation/agitation à

haute vitesse, tout en maintenant la température réactionnelle au dessus de la température de fusion de la substance mise en oeuvre. On obtient in fine une dispersion de PSM dans une phase aqueuse continue. L'eau est absente, ou quasiment absente, des microparticules de PSM.

- 5 De tels vecteurs ont l'inconvénient d'être spécifiques et exclusifs aux PA hydrophobes. En outre, les températures élevées, requises pour la conduite du procédé de préparation des ces PSM, peuvent être préjudiciables aux PA.

On connaît, également, des systèmes de vectorisation faisant intervenir des émulsions lipidiques constituées par des gouttelettes d'huile liquide dispersées  
10 dans une phase aqueuse et stabilisées par un film interfacial d'émulsifiant (lécithines). La vectorisation de PA à l'aide de PV, constituant la phase hétérogène d'émulsion lipidique, est décrite dans la demande de brevet international PCT WO 91/02 517. La cohésion, l'intégrité ou la stabilité de tels PV est précaire ou fragile. En effet, ces PV n'ont pas d'existence physique, i. e. ils ne forment pas de corps certain, en dehors du  
15 milieu d'émulsion. Dès lors que l'équilibre instauré par le tensioactif est perturbé, les gouttelettes d'huile liquide coalescent et disparaissent. En conséquence, ces émulsions lipidiques n'offrent que très peu de débouchés dans la vectorisation de PA.

Le brevet US 4 610 868 concerne un nouveau type de PV lipidique, qui peut être décrit comme étant une structure globulaire formée par une matrice  
20 lipidique. Ces PV, également dénommés LMC, ont une taille comprise entre 0,5  $\mu\text{m}$  et 100  $\mu\text{m}$ . Les constituants de base des LMC sont un composé hydrophobe, un composé amphiphile et, éventuellement, un PA accompagné d'eau si ce dernier est de nature hydrosoluble.

Le composé hydrophobe est, de préférence, une huile à base de triglycéride, telle que  
25 l'huile de maïs ou l'huile de noix de coco. Les stérols peuvent également convenir comme composés hydrophobes.

Les composés amphiphiles préconisés sont ceux de nature lipidique, tels que les phosphoglycérides et, plus particulièrement, la phosphatidylcholine du jaune d'oeuf.

La préparation de ces LMC fait intervenir un solvant organique, tel que l'acétone ou  
30 l'éthanol. Selon un mode particulier de mise en oeuvre du procédé de préparation de ces LMC, une émulsion eau dans huile - obtenue à partir d'huile de phosphatidylcholine, d'eau et de PA hydrosolubles - est extrudée dans le solvant organique sous agitation. Les LMC sont générés au moment de l'introduction de l'émulsion E/H dans le solvant. Dans le cas où le PA est hydrophobe, le mélange  
35 d'huile amphiphile et de PA s'opère dans le solvant organique, ledit mélange étant ensuite extrudé dans une phase aqueuse.

Pour les PA solubles dans l'eau, il est envisageable d'éliminer totalement la phase aqueuse et d'extruder le mélange huile + amphiphile + PA dans le solvant organique. Après élimination du solvant organique ou aqueux, on récupère des LMC qui, selon le brevet, sont décrites comme ressemblant à des gouttelettes d'huile qui ne coalescent pas.

Ces LMC présentent l'inconvénient majeur de nécessiter la mise en oeuvre de solvants lors de leur préparation et l'on sait que la présence de solvant, même à l'état de traces dans les PV, est particulièrement indésirable. On soulignera la nature exclusivement lipidique des LMC. Enfin, il doit être considéré que le procédé d'obtention des LMC est relativement complexe et peu commode à mettre en oeuvre de façon industrielle (extrusion dans un solvant).

Dans cet état de connaissances, l'un des objectifs essentiels de la présente invention est de fournir des PV, en particulier submicroniques et microniques, à base de lipides et susceptibles de servir de vecteurs d'un principe actif (PA), en particulier médicamenteux et/ou nutritionnel, pour l'administration dudit PA à un organisme humain ou animal, ces PV satisfaisant pleinement au cahier des charges explicité supra et répété ci-après :

- 1 - Il devrait, avantageusement, être possible de pouvoir disposer de PV de diamètre moyen compris entre une fraction de micron et quelques microns, avec une répartition granulométrique étroite, de façon à pouvoir adapter la granulométrie des PV au mode d'administration choisi et/ou le site thérapeutique visé. Par exemple, si une immunisation mucosale par la voie orale est recherchée, la taille des PV doit être comprise entre 0,5  $\mu\text{m}$  et 10  $\mu\text{m}$ , afin que les PV puissent pénétrer les plaques de Peyer et atteindre les tissus lymphoïdes. Dans le cas d'une administration sous-cutanée, il y a avantage à disposer de PV de taille supérieure à 10  $\mu\text{m}$  pour que les particules ne rentrent pas dans la circulation générale où elles sont rapidement internalisées par le système réticulo-endothélial, mais qu'elles diffusent progressivement depuis leur site d'injection.
- 2 - Cette spécification implique un contrôle dimensionnel des PV, à la fois sur la distribution de la granulométrie des PV et sur leur diamètre moyen, qui représente une opération très délicate sur le plan technologique.
- 2 - Il est souhaitable que les PV assurent la protection du PA jusqu'au site de libération. Par exemple, dans une administration orale d'un PA formé par un vaccin, ce dernier gagnerait à être protégé, tout au long du tractus gastrointestinal.

- 3 - Il est préférable que le polymère, constituant les **PV**, soit biocompatible et biodégradable et, encore mieux, qu'il soit métabolisé en produits non toxiques pour l'organisme.
- 4 - Il est également avantageux que le polymère, constitutif des **PV**, n'induisse pas de réponse immunitaire (immunogéniale).
- 5 - On attend des **PV** qu'elles permettent la libération contrôlée et prolongée de **PA**.
- 6 - Enfin, il est également préférable que les **PV** puissent être obtenues par un procédé non dénaturant pour le **PA**. Ainsi, l'usage de solvants organiques et/ou de températures élevées ou des modifications drastiques de pH sont à proscrire.

10 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des **PV** à base de lipides qui soient stables au stockage, quel que soit le milieu extérieur, c'est-à-dire qui gardent leur intégrité physique, aussi bien dans une phase continue formée par de l'eau, par une solution aqueuse ou par un solvant organique, de sorte qu'elles ne doivent pas avoir tendance à coalescer entre elles.

15 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des **PV** à base de lipides qui soient d'une granulométrie moyenne contrôlable et ajustable.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des **PV** qui soient simples à préparer (pH non agressif), stables à tout pH compris entre 2 et 13 et non immunogènes.

20 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des **PV** à base de lipides qui soient faisables industriellement et économiques et qui soient aptes à se charger en **PA** hydrophile tout comme lipophile avec des forts taux de chargement.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir un procédé de préparation de **PV** à base de lipides et susceptibles d'être utilisées comme vecteurs de **PA**, ledit procédé se devant d'être économique, simple à mettre en oeuvre, non dénaturant pour les **PA** et devant, en outre, permettre une maîtrise fine de la granulométrie moyenne des particules obtenues.

25 Un autre objectif essentiel de l'invention est l'utilisation des susdites particules pour la préparation de médicaments (e. g. vaccins) et/ou de nutriments, en particulier pour administration *per os*, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou parentérale, de principes actifs, tels que des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, des oligonucléotides et des polynucléotides.

30

35

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir un médicament du type système à libération prolongée de PA, qui soit biocompatible et qui procure une haute biodisponibilité du PA.

## 5    **BREF EXPOSE DE L'INVENTION :**

Les objectifs relatifs aux produits, parmi d'autres, sont atteints par la présente invention qui concerne des particules, notamment de vectorisation de principe(s) actif(s), du type de celles à base de microparticules susceptibles d'être  
10    utilisées comme vecteurs de principe(s) actif(s) (PA), caractérisées :

\*  $\alpha$  \* en ce qu'elles ont chacune une structure cohésive faite de gel-composite, physico-chimiquement stable et intègre,

\*  $\beta$  \* en ce qu'elles tirent leur cohésion de la présence des trois composés suivants :

15

(I) de l'huile,

(II) une phase aqueuse,

(III) et au moins un copolyaminoacide linéaire non réticulé, synthétique et comportant au moins deux types différents de comonomères aminoacides AA<sub>i</sub> hydrophile et AA<sub>o</sub>  
20    hydrophobe,

\*  $\gamma$  \* et en ce qu'elles présentent une taille moyenne contrôlable et ajustable sur une gamme inférieure ou égale à 500  $\mu$ m, de préférence à 200  $\mu$ m et, plus préférentiellement, comprise entre 0,05 et 100  $\mu$ m.

25

Il est du mérite de la demanderesse d'avoir mis au point ces microparticules en partie lipidiques, en procédant, d'une part, à une sélection de produits constitutifs particuliers, à savoir huile, eau et copolyaminoacide spécifique, et, d'autre part, en mettant au point un protocole d'obtention desdites microparticules qui permet, de manière tout à fait surprenante et inattendue, de conduire à une  
30    suspension colloïdale de particules cohésives bien différenciées et extrêmement stables.

La stabilité est bien l'une des caractéristiques originales les plus étonnantes des particules selon l'invention. Celles-ci conservent, en effet, leur intégrité et leur caractère différencié, aussi bien dans un milieu liquide, quel que soit le pH du milieu,  
35    qu'à l'état de lyophilysat. En d'autres termes, cela signifie qu'elles peuvent être isolées par filtration ou décantation (par centrifugation e. g.), sans coalescer. Elles forment

donc des entités de type gel composite, qui possèdent leur identité et leur existence propre, quel que soit leur milieu de stockage.

Au sens de la présente invention, le terme "gel composite" désigne ou fait référence à une notion de gel physique à base d'eau, d'huile et de polymère.

5 Les PV selon l'invention sont, par ailleurs, des biovecteurs, aptes à inclure tout principe actif, quelle que soit sa nature hydrophile ou hydrophobe, et à assurer son transport à l'intérieur de l'organisme. Ces PV sont des biovecteurs d'autant plus convenables :

- 10 - qu'ils sont non immunogènes, biodégradables et exempts de produits toxiques de structuration et/ou de fabrication, et ce même à l'état de traces (solvants, glutaraldéhyde),
- et que leur taille (granulométrie) est contrôlable sur une large gamme.

En définitive, les PV sont des microparticules stables et cohésives. Elles ne coalescent pas, à la différence des gouttelettes d'émulsion.

15

#### DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION :

La morphologie de ces PV cohésives selon l'invention, apparaît clairement sur les photographies en Microscopie Electronique à Balayage (MEB) données aux 20 fig. 1 et 2 annexées. La description de ces photographies MEB est reprise ci-après, notamment dans les exemples. Mais on peut, d'ores et déjà, remarquer que ces PV de gel-composite sont de forme sensiblement sphérique, d'aspect lisse. Elles sont bien différenciées les unes des autres.

25 S'agissant de leur structure, il est possible d'indiquer qu'il ne s'agit pas d'une organisation en feuillets du type de celle des liposomes, pas plus que de simples gouttelettes de phase hétérogène d'émulsion H/E ou E/H.

A défaut d'éléments tangibles de caractérisation de leur structure, la demanderesse a pu définir ces PV de gel-composite au travers de particularités fonctionnelles et, plus précisément, de comportement de ces PV des tests d'évaluation 30 technique discriminants.

Ainsi, les caractéristiques \*  $\alpha$  \* des PV visées ci-dessus sont reflétées par au moins l'une des propriétés fonctionnelles suivantes :

- 35 -  $\alpha_1$  - absence de coalescence des microparticules suite à un traitement de lyophilisation, cette non-coalescence se traduisant par une conservation de la répartition granulométrique, en particulier du D[4,3] à raison de  $\pm 20$  %, après réhydratation selon un test  $\alpha_1$  ;

- $\alpha_2$  - absence de coalescence à la centrifugation se traduisant par une conservation de la répartition granulométrique et, en particulier du D[4,3] à raison de  $\pm 20 \%$ , selon un test  $\alpha_2$  ;
- 5 -  $\alpha_3$  - résistance aux variations de pH se traduisant par une conservation de la répartition granulométrique des microparticules et, en particulier, du D[4,3] à raison de  $\pm 20 \%$ , après soumission des pH de 3 et de 13, selon un test  $\alpha_3$  ;
- 10 -  $\alpha_4$  - absence de coalescence en dispersion dans une solution aqueuse tamponnée, se traduisant par une conservation de la répartition granulométrique des microparticules, en particulier de leur D[4,3] à raison de  $\pm 20 \%$ , pendant des durées de stockage supérieures ou égales à 3, 9 et 18 mois à des températures de 37 °C, ambiante et 4 °C respectivement, selon un test  $\alpha_4$ .

15 Les tests,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ , dont il est question supra, sont utiles comme normes de définition dans le cadre du présent exposé. Ces tests sont définis en détail ci-après.

- *Test  $\alpha_1$  de stabilité des PV à la lyophilisation/réhydratation :*

20 Dans un ballon de 500 ml, on prépare 50 ml d'une suspension de PV à 0,2 % en poids, calculé sur la base de la masse de polymère constituant les PV. La phase aqueuse saline tamponnée employée est constituée par du PBS 0,01 M (tampon phosphate, pH 7,4 à 25 °C).

25 Cette solution est ensuite congelée dans de l'azote liquide avant d'être lyophilisée à l'aide d'un dispositif de lyophilisation de marque CHRIST-ALPHA1-4 en soumettant l'échantillon à une pression de 20 Pa, à une température de - 52 °C pendant 48 h.

On hydrate ensuite le lyophilisat ainsi obtenu en le mettant en présence d'un volume de phase aqueuse identique à celle utilisée pour la mise en suspension et représentant 5 ml.

30 La répartition granulométrique des PV ainsi réhydratées est mesurée par diffraction laser à l'aide d'un COULTER LS 130 selon un modèle de calcul FRAUNHOFER avec "PIDS". Cela permet d'obtenir le D[4,3].

On effectue une même mesure de répartition granulométrique avec détermination du D[4,3] avec la suspension de PV préparée ci-dessus et on compare les D [4,3] obtenus avec et sans lyophilisation/réhydratation.

- *Test  $\alpha_2$  de stabilité des PV à la centrifugation :*

On réalise une suspension de **PV** de la même façon que celle selon le test  $\alpha_1$  décrit ci-dessus, à la différence près que la concentration des **PV** dans la suspension est de 2 % en poids au lieu de 0,2 %.

- 5 On centrifuge un échantillon de 1,5 ml de la susdite suspension à l'aide d'une centrifugeuse de marque SIGMA 3K30, pendant 10 min à 60 000 g.

L'échantillon est agité manuellement pour remettre en suspension les **PV**, après centrifugation.

- 10 On réalise les mesures granulométriques (D[4,3]) comme décrit dans le test  $\alpha_1$  ci-dessus. On compare les D[4,3] obtenus avant et après centrifugation.

- *Test  $\alpha_3$  de résistance au pH des PV :*

On introduit 0,5 ml de suspension de **PV** à 2 % (concentration exprimée de la même façon que celle donnée au test  $\alpha_1$ ) dans 5 ml d'une solution d'HCl titrant  $10^{-2}$  N (pH 2).

- 15 On stocke une journée à température ambiante.

La suspension est neutralisée par introduction de 50  $\mu$ l de soude 1 N. On complète à 10 ml avec une solution saline tampon phosphate (PBS), pH 7,4.

- 20 On réalise les mesures granulométriques de D[4,3] sur des suspensions ayant et celles n'ayant pas subi d'abaissement du pH à une valeur de 2. On compare les D[4,3] obtenus dans les deux cas de figures.

On réalise exactement la même opération, mais cette fois en introduisant 0,5 ml de suspension de **PV** à 2 % (concentration exprimée de la même façon que celle donnée au test  $\alpha_1$ ) dans 5 ml de soude à  $10^{-1}$  N. On neutralise par addition de 0,5 ml d'HCl 1 N. On complète à 10 ml avec une solution saline tampon phosphate isotonique (PBS), pH 7,4.

- 25 On procède aux mêmes mesures et aux mêmes comparaisons granulométriques de D[4,3].

- *Test  $\alpha_4$  de stabilité au stockage des PV :*

- 30 On réalise une suspension de **PV** en tous points identique à celle préparée conformément au test  $\alpha_2$  décrit ci-dessus.

Des échantillons de cette suspension (2 ml) sont stockés à des températures de 2, 4 et 37 °C et à température ambiante.

- 35 On effectue un suivi de la répartition granulométrique et, en particulier, du D[4,3] (même méthode de mesure que pour les tests  $\alpha_1$  à  $\alpha_3$  ci-dessus) en fonction du temps de stockage.



On compare les valeurs de  $D[4,3]$  obtenues après différentes durées de stockage dans les différentes conditions de température, par rapport à une référence de  $D[4,3]$  mesurée sur la suspension juste après sa préparation ( $t = 0$ ).

On fixe arbitrairement les seuils de durée de stockage avec conservation de la répartition granulométrique des PV comme indiqué ci-après :

- \* supérieure ou égale à trois mois à 37 °C ;
- \* supérieure ou égale à neuf mois à température ambiante ;
- \* supérieure ou égale à dix-huit mois à 4 °C.

De préférence, les PV de gel-composite selon l'invention possèdent au moins deux des caractéristiques fonctionnelles  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  et, plus préférentiellement encore,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ .

Ces caractéristiques sont illustrées infra dans les exemples.

Comme indiqué supra, la sélection du copolyaminoacide est l'un des paramètres cruciaux de l'invention. C'est ainsi que, conformément à une caractéristique préférée, le copolyaminoacide (III) présente :

- \* des comonomères  $AA_i$  choisis dans le groupe d'acides aminés suivants : acide glutamique, acide aspartique, ornithine, arginine, lysine, asparagine, histidine et leurs mélanges,
- \* ainsi que des comonomères  $AA_o$  choisis dans le groupe d'acides aminés suivants : leucine, tyrosine, phénylalanine, valine, cystine, isoleucine et leurs mélanges.

Plus préférentiellement encore, le copolyaminoacide (III) comprend un comonomère  $AA_i$  formé par l'acide glutamique et/ou l'acide aspartique, ainsi qu'un monomère  $AA_o$  formé par la leucine et/ou l'isoleucine et/ou la tyrosine et/ou la phénylalanine.

Les copolyaminoacides (III) linéaires selon l'invention peuvent être de structure statistique ou de structure dibloc, tribloc ou multiblocs, la structure dibloc étant préférée pour des raisons de non-immunogénicité.

Par structure statistique, on entend un copolymère obtenu à partir de comonomères ayant des rapports de réactivité différents, ce qui implique que la composition de ces copolymères, dits statistiques, varie en fonction du degré de conversion.

Un exemple de copolyaminoacide (III) plus spécifiquement adapté à l'invention est le Leu/Glu et, en particulier, celui dosé à 50/50.

Le fait de limiter le nombre de comonomères à deux acides aminés, un AA<sub>0</sub> et un AA<sub>i</sub>, permet de minimiser l'immunogénicité des particules PV. Il s'agit là d'un avantage notable de cette forme préférée de réalisation de l'invention.

Outre leur structure linéaire préférée à enchaînements  $\alpha$ -peptidiques, les copolyaminoacides (III) ont, pour autre caractéristique, d'avoir une masse molaire  $M_w$  élevée, c'est-à-dire supérieure ou égale à 5 000 D, de préférence comprise entre 8 000 et 100 000 D. De manière plus privilégiée, on sélectionne la masse molaire  $M_w$  des copolyaminoacides (III) en fonction de leur nature : multibloc ou statistique (randon). Dans le cas de polyaminoacides multibloc (III), en particulier dibloc, on préfère ceux de masse  $M_w$  supérieure ou égale à 5 000 D et, de préférence, comprise entre 3 000 et 100 000 D et, plus préférentiellement encore, entre 5 000 et 20 000 D. S'agissant des copolyaminoacides (III) de type statistiques randoms, on retient, plus volontiers, ceux de  $M_w$  supérieure ou égale à 50 000 D, de préférence comprise entre 10 000 et 300 000 D et, plus préférentiellement encore, comprise entre 10 000 à 100 000 D.

En fait, ces copolyaminoacides (III) sont des copolymères amphiphiles formés par un premier type de monomères AA<sub>0</sub> qui est un acide aminé neutre hydrophobe et par au moins un deuxième type de comonomères AA<sub>i</sub> qui est un acide aminé présentant une chaîne latérale de fonctionnalité carboxyle (Glu/Asp) ionisable à des pH physiologiques non dénaturants pour les protéines. Ces PAA (III) amphiphiles peuvent interagir, à la fois avec des substances hydrophobes et avec des substances hydrophiles, ce qui leur confère des propriétés remarquables comme tensioactifs ou dispersants. Ils participent ainsi à l'effet étonnant par lequel les PV acquièrent et conservent la qualité de corps certains stables.

S'agissant de la disponibilité des PA (III), il faut signaler qu'il existe de nombreuses techniques de synthèse de polymères d' $\alpha$ -aminoacides à blocs ou statistiques ou de polymères à chaînes multiples ou bien encore de polymères contenant une séquence déterminée d'aminoacides (cf. Encyclopedia of Polymers Science and Engineering (vol. 12, page 786, Ivan WILEY & Sons). De nombreux dérivés d'aminoacides et de peptides ont été utilisés comme monomères pour la préparation des polyaminoacides. Cependant, les monomères servant le plus couramment sont les anhydrides des N-carboxy- $\alpha$ -aminoacides dont la préparation est donnée, par exemple, dans Biopolymers, 15, 1869 (1976). Les techniques de polymérisation de ces monomères sont connues de l'homme de l'art et sont détaillées dans l'ouvrage de H. R. KRICHELDORF " $\alpha$ -Aminoacid-N-Carboxy Anhydrides and Related Heterocycles" Springer Verlag (1987);

Les techniques de synthèse impliquent, généralement, de protéger les fonctions réactives des acides aminés à chaînes latérales ionisables, afin qu'elles n'interfèrent pas lors de l'étape de polymérisation. Il s'ensuit qu'une étape de déprotection est nécessaire pour rétablir la fonctionnalité des chaînes latérales ionisables du polymère.

- 5 On peut citer, par exemple, les procédés de déprotection par saponification des esters méthyliques (STAHMAN et coll ; J. Biol. Chem., 197, 771 (1952) ; KYOWA HAKKO, FR 2 152 582) ou de débenzylation [BLOUT et coll. ; J. Amer. Chem. Soc., 80, 4631 (1958)].

- 10 S'agissant désormais de l'huile (I), on peut indiquer qu'au sens de l'invention une huile désigne un corps liquide à température ambiante et qui, en outre, n'est pas ou peu miscible à l'eau. Les matières grasses liquides à température ambiante répondent à cette définition. Il en va de même en ce qui concerne les huiles silicones.

Aussi, conformément à une caractéristique préférée de l'invention, l'huile (I) est formée par un ou plusieurs composés gras sélectionnés dans le groupe suivant :

- 15 \* triglycéride(s) d'acide d'ester gras à chaînes moyennes d'origine animale, végétale ou synthétique,  
\* paraffine(s),  
\* huile(s) polysiloxane(s),  
\* acides gras d'origine animale ou végétale,  
20 \* acides gras, leurs esters et/ou leurs sels.

Comme exemple d'huile particulièrement adaptée au PV selon l'invention, on peut citer

- les huiles triglycéridiques du type huile de noix de coco (telle que celle commercialisée sous la marque "MYGLIOL®" par la Société DYNAMIT  
25 NOBEL,  
- l'huile de maïs,  
- la paraffine,  
- l'huile d'olive,  
- le palmitate d'isopropyl,  
30 - le stéarate de butyle,  
- l'oléate d'éthyle,  
- les esters d'acides eicosapentanoïques docosahexanoïques,  
- le benzoate d'alkyle,  
- les acides eicosapentanoïques docosahexanoïques,  
35 - les triglycérides d'acides eicosapentanoïque docosahexanoïque,  
- les triglicérides d'acides caprylique,

- l'huile de silicone.

L'huile (I) peut être constituée par un seul type de corps gras liquide à température ambiante ou par un mélange de plusieurs de ceux-ci.

5 Selon une variante, l'huile ou les huiles (I) peuvent être fractionnées ou non. Le fractionnement permet d'éliminer certaines coupes d'acides gras, de façon à modifier la température de fusion et la viscosité.

S'agissant précisément de la température de fusion, on peut préciser, pour fixer les idées, que celle de l'huile (I) est inférieure ou égale à 50 °C, de préférence à 40 °C et, plus préférentiellement, à 35 °C.

10 La viscosité de l'huile (I) à 25 °C est, en pratique, comprise entre 10 mPa.s et 3 000 mPa.s.

Sur le plan quantitatif, l'huile (I) représente de 9 à 90 % en poids, de préférence de 20 à 80 % en poids et, plus préférentiellement encore, de 40 à 60 % en poids des PV.

15 En ce qui concerne la phase aqueuse (II) des microparticules lipidiques ici considérées, elle est, de préférence, constituée par une solution saline qui sera, avantageusement, tamponnée, de manière à avoir un pH compris entre 5 et 9, de préférence entre 6 et 8 et, plus préférentiellement encore, de l'ordre de 7,4.

Les solutés de cette solution sont des sels comme, par exemple, le NaCl.

20 Avantageusement, la molarité de la solution saline est comprise entre  $10^{-4}$  M et 1 M, de préférence entre  $10^{-2}$  M et 0,5 M environ.

Les tampons éventuellement mis en oeuvre sont, par exemple, les suivants : phosphate, phtalate, borate, etc.

25 Le fait que la phase aqueuse soit préférentiellement formée par une solution saline, n'est pas exclusive de la variante dans laquelle on a affaire à de l'eau, avantageusement désionisée.

Les microparticules lipidiques préférées conformément à l'invention sont celles caractérisées par la composition suivante :

30 (I) triglycéride(s) d'acide d'ester gras à chaînes moyennes, l'huile de coco étant particulièrement préférée,

(II) eau déionisée ou solution saline tamponnée, le pH de cette phase aqueuse étant compris entre 6 et 8,

(III) copolyaminoacide de type Leu/Glu, de préférence 50/50.

35 Au-delà des caractéristiques structurelles et fonctionnelles des PV, telles qu'elles ont été énoncées ci-dessus, la présente invention a également pour objet un procédé de préparation de microparticules, notamment du type de celles définies

supra, caractérisé en ce qu'il comprend, essentiellement, les étapes suivantes, successives ou non :

- 5                   - a - préparation d'un gel à partir de la phase aqueuse (II) et d'au moins un copolyaminoacide (III), (II) et (III) étant tels que définis dans la description,
- b - mise en présence du gel issu de l'étape - a - avec de l'huile (I), telle que définie dans la description,
- c - agitation du mélange gel + (I) conduisant à une dispersion de microparticules dans une phase continue huileuse ou aqueuse (I),
- 10               - d - éventuelle séparation des microparticules et de la phase continue huileuse ou aqueuse, de préférence par centrifugation,
- e - éventuelle redispersion des microparticules recueillies à l'issue de l'étape - e - dans un liquide de stockage,
- f - éventuel traitement de lyophilisation des microparticules de
- 15               l'étape - d -, redispersées ou non.

L'un des fondements de ce procédé et des microparticules qui en découlent tient à l'étape - a - de préparation d'un gel issu de l'association du copolyaminoacide (III) et de la phase aqueuse (II). Il s'agit, plus précisément, de mélanger (II) à (III) dans des proportions telles que (III) représente de 2 à 50 %, de

20               préférence de 5 à 30 % en poids du gel (III) + (II). Ce mélange s'effectue sous agitation grâce à tout moyen d'agitation connu en lui-même et approprié. Il peut s'agir, par exemple, d'un dispositif du type Vortex ou bien encore du type rotor-stator, barreau magnétique, ultrasons, homogénéiseur haute pression.

Avantageusement, cette étape - a - est assortie d'un traitement d'élimination de la

25               mousse formée lors de l'agitation. Une telle élimination peut être, par exemple, réalisée par centrifugation.

Le gel obtenu à l'étape - a - est ensuite mis en présence de tout ou partie de l'huile (I) (étape - b -), le mélange ainsi formé étant ensuite soumis à une agitation (étape - c -) avec des moyens d'agitation du même type que ceux évoqués pour l'étape - a -. Cette

30               étape - c - correspond à l'étape de formation des microparticules lipidiques.

L'introduction de l'huile (I) dans le mélange de l'étape - b - peut être effectuée en une ou plusieurs fois au cours de l'étape - c -.

Il est clair que les conditions d'agitation sont déterminantes pour la formation des PV lors de l'étape - c -, en particulier eu égard à la nature de la phase homogène

35               contenant les PV : eau ou huile.

Aussi, selon un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, conduisant à des **PV** gel-composite en suspension dans une phase aqueuse, cette agitation - c - est réalisée à l'aide d'un dispositif rotor/stator et en mettant en oeuvre une vitesse d'agitation comprise entre 1 000 et 40 000, de préférence 5 000 et 25 000 tr/min.

- 5            Selon une variante de ce mode préféré, dans laquelle on vise l'obtention de **PV** en suspension dans une phase huileuse, on enrichit la suspension en huile. Au terme de l'étape - c -, il est possible d'obtenir un produit intermédiaire intéressant, formé par une dispersion concentrée de **PV** dans l'eau ou une suspension de **PV** dans l'huile. Dans ce dernier cas, on peut éliminer l'huile excédentaire et on obtient alors un
- 10    sédimentat concentré en **PV**.

La présente invention a donc également pour objet cette dispersion et ce sédimentat concentrés de **PV** dans l'eau, qui peuvent être considérés comme des produits intermédiaires.

Ces produits intermédiaires sont caractérisés par :

- 15            \*
- \* une concentration moyenne en copolyaminoacides (III) variant de 1 % à 50 % en poids, de préférence de 2 % à 40 % en poids, cette concentration s'établissant, plus préférentiellement encore, de 3 % à 30 % en poids ;
  - \* une concentration en huile (I) représentant de 9 à 90 % en poids,
  - 20            de préférence de 20 à 80 % en poids et, plus préférentiellement encore, de 40 à 60 % en poids ;
  - \* une concentration en phase aqueuse de 5 à 90 %, de préférence de 10 à 70 %, plus préférentiellement encore de 30 à 50 % en poids ;

- 25    les concentrations ci-dessus étant exprimées par rapport à la masse totale de la dispersion ou du sédimentat concentrés en **PV**.

Les quantités relatives d'huile (I) et de phase aqueuse (II) prévaudront l'une sur l'autre, selon la nature hydrophile ou hydrophobe visée pour les **PV**. Dans l'application biovecteur, cette nature sera fonction du principe actif à vectoriser.

- 30            Pour récapituler, on peut donc indiquer que les microparticules selon l'invention peuvent être définies par les caractéristiques quantitatives suivantes, selon lesquelles leurs constituants (I), (II), (III) sont présents dans les proportions ci-après, exprimées en % en poids par rapport à (I) + (II) + (III) :

- (I)    9 à 90, de préférence 20 à 80 et, plus préférentiellement encore,
- 35            40 à 60,

(II) 5 à 90, de préférence 10 à 70 et, plus préférentiellement encore, 30 à 50,

(III) 1 à 50, de préférence 2 à 20 et, plus préférentiellement encore, 3 à 10.

5 La récupération des microparticules (étape - d -) peut être effectuée par tous moyens connus et appropriés, la centrifugation ou la décantation sont des exemples de tels moyens.

Le milieu de dispersion des PV récupérées à l'étape - d - peut être de l'eau déionisée filtrée ou une solution solide tamponnée, éventuellement additionnée d'au moins un

10 agent bactériostatique.

Avantageusement, la température à laquelle s'effectuent les étapes - a - à - c -, voire - d - à - f - du procédé selon l'invention, est comprise entre 4 °C et 60 °C. La température ambiante est particulièrement appropriée, celle-ci étant, de préférence, comprise entre 10 et 35 °C.

15 Comme cela ressort de ce qui précède, le procédé selon l'invention permet la génération spontanée de microparticules lipidiques grâce à un protocole remarquable de simplicité, d'économie et donc de faisabilité industrielle. On observera, également, que le procédé selon l'invention est incontestablement et invariablement sûr, puisqu'il ne prévoit pas le recours à des réactifs ou solvants toxiques.

20 Les paramètres importants du procédé selon l'invention sont, notamment, la nature de l'huile (I), la composition du copolyaminoacide (III) et sa concentration, la concentration de la solution saline (II), les conditions d'agitation et le pH du milieu réactionnel.

L'homme du métier est apte à maîtriser relativement aisément toutes ces

25 conditions de préparation des PV selon l'invention. En particulier, il est tout à fait à sa portée de contrôler et d'ajuster la granulométrie des microparticules lipidiques en jouant sur les conditions d'agitation et sur le rapport des viscosités des phases en présence, entre autres.

Dans la mesure où l'une des applications les plus remarquables des

30 particules selon l'invention est le transport sous protection de principes actifs (PA) dans l'organisme humain ou animal, il convient d'apporter des précisions, à ce stade de l'exposé, sur la ou les techniques d'inclusions du PA dans les PV.

L'une des techniques d'inclusion préférée conformément à l'invention consiste à dissoudre ou à mettre en suspension ledit PA :

- 35 - dans l'huile (I),  
- et/ou dans la phase aqueuse (II),

- et/ou dans le polyaminoacide (III),
- et/ou dans le gel de l'étape - a -.

Le PA à inclure dans les PV peut se présenter sous forme solide ou sous forme de solution ou de dispersion.

5 Le principe actif, susceptible d'être inclus ou incorporé dans les PV selon l'invention, peut être médicamenteux et/ou nutritionnel. Dans le cas où il est médicamenteux, le PA est, de préférence, choisi parmi :

- 10 \* les protéines et/ou les peptides parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les antigènes, les anticorps, la calatone, l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, le facteur IX, l'interleukine ou leurs mélanges,
- \* les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée,
- 15 \* les acides nucléiques et, préférentiellement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN,
- \* et leurs mélanges.

Les PA, que l'on peut classer dans la catégorie des médicaments et qui sont propres à être vectorisés par les particules selon l'invention, sont les vaccins.

20 A titre d'exemples de PA nutritionnels, on peut citer les vitamines, les acides aminés et les oligo-éléments.

#### APPLICATION INDUSTRIELLE :

25 Selon un autre de ses aspects, l'invention vise également l'utilisation de PV chargés en PA, pour la fabrication de médicaments, notamment du type système à libération contrôlée de PA.

La présente invention concerne enfin les médicaments et les spécialités pharmaceutiques et nutritionnelles comprenant les microparticules chargées en PA, 30 telles que décrites ci-dessus.

Les spécialités pharmaceutiques concernées sont, notamment, celles pour administration, de préférence, par voies orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou parentérale.

35 Les applications de l'invention ne sont pas limitées à la vectorisation, au transport de PA de nature médicamenteuse ou nutritionnelle. En effet, il est tout à fait



concevable que le PA, susceptible d'être inclus ou incorporé dans les PV, soit un produit cosmétique ou phytosanitaire.

Les applications cosmétiques envisageables sont, par exemple, les compositions applicables par voie transdermique.

5 Les produits phytosanitaires concernés peuvent être, par exemple, des herbicides et/ou des fongicides et/ou des bactéricides et/ou des virucides et/ou des insecticides, entre autres.

10 La présente invention a également pour objet les compositions phytosanitaires et cosmétiques comprenant des PV chargées en PA du type de ceux visés supra.

Les exemples qui suivent permettront de mieux comprendre l'invention dans ses différents aspects produits/procédés/applications. Ces exemples illustrent la préparation de microparticules PV, chargées ou non en principes actifs et à base d'huile (I), d'eau (II) et de PAA (III). Ces exemples montrent, également, les caractéristiques de structure, ainsi que les propriétés desdites microparticules.

15 L'illustration des exemples est donnée par les fig. 1 à 11 dont la description suit.

## DESCRIPTION DES FIGURES

20

La fig. 1 est une photographie en microscopie électronique à balayage (MEB) des PV gel-composite préparées à l'exemple 4, grossissement : 1 500 x.

La fig. 2 est une photographie en microscopie électronique à balayage (MEB) des PV gel-composite préparées à l'exemple 5, grossissement : 3 200 x.

25 La fig. 3 est un histogramme de répartition volumique de PV de gel-composite : volume différentiel (V) en % en fonction du diamètre (D) en  $\mu\text{m}$  (exemple 4).

30 La fig. 4 est un histogramme de répartition volumique de PV de gel-composite lyophilisées et réhydratées : volume différentiel (V) en % en fonction du diamètre (D) en  $\mu\text{m}$  (exemple 4).

La fig. 5 est un histogramme de répartition volumique de PV de gel-composite : volume différentiel (V) en % en fonction du diamètre (D) en  $\mu\text{m}$  (exemple 5).

35 La fig. 6 est un histogramme de répartition volumique de PV de gel-composite : volume différentiel (V) en % en fonction du diamètre (D) en  $\mu\text{m}$  (exemple 6).

La fig. 7 est un histogramme de répartition volumique de PV de gel-composite (volume différentiel (V) en % en fonction du diamètre (D) en  $\mu\text{m}$ ) :

- courbe 1 : avant lyophilisation/réhydratation,
- courbe 2 : après lyophilisation/réhydratation (exemple 7).

5 La fig. 8 représente un histogramme donnant les diamètres moyens volumiques  $D[4,3]$  et les écarts-types (SD) mesurés pour les répartitions granulométriques des PV selon les essais 1 à 14 de l'exemple 9.

La fig. 9 est un graphe donnant le pourcentage R de relargage du PA = cytochrome en fonction du temps de séjour T en heures (exemple 11).

10

### EXEMPLES

#### EXEMPLE 1 : SYNTHÈSE DU RANDOM (STATISTIQUE) POLY(LEUCINE-GLUTAMATE DE SODIUM) 50/50.

15

ETAPE 1) : COPOLYMERISATION DES NCA- LEU ET NCA-GLU(OMe) : POLY(LEU-CO-GLU(OMe)) 50/50 :

Dans un réacteur de 1 l, muni d'un agitateur en verre, d'une arrivée d'azote et d'une sortie reliée à un bulleur, on introduit, sous courant d'azote, 15,0 g de N-carboxyanhydride de la glutamate de méthyle (NCA-Glu(OMe) : 0,08 mole) et 12,5 g de N-carboxyanhydride de la leucine (NCA-Leu : 0,08 mole). 381 ml de dioxane sont rajoutés et le milieu réactionnel est porté à 40 °C.

20

Après dissolution des NCA, on introduit 24 ml d'eau, suivi de 0,22 ml de triéthylamine (soit 1 % molaire par rapport aux NCA). Le suivi de la polymérisation est effectué par IR en observant la disparition des bandes carbonyles à 1 860 et 1 790  $\text{cm}^{-1}$ . La durée de polymérisation varie entre 1,5 h et 3 h selon la composition des monomères. Après disparition totale des bandes, le milieu réactionnel est dilué par 380 ml de dioxane, puis homogénéisé pendant 3 h à température ambiante. Le copolymère est récupéré par précipitation dans 5 l d'eau sous bonne agitation. Le produit est filtré et séché à 50 °C sous vide pendant 12 h.

25

30

La masse de copolymère obtenu est de 18,4 g, soit un rendement pondéral de 90 %.

RMN  $^1\text{H}$  (acide trifluoroacétique-d) : 0,85 ppm ( $\text{CH}_3$ -Leu, 6H\*0,5) ; 1,58 ( $\text{CH}_2$  et  $\text{CHMe}_2$  Leu, 3H\*0,5) ; 2,10 et 2,22 ( $\text{CH}_2$ -Glu, 2H\*0,5) ; 2,58 ( $\text{CH}_2$ -Glu ; 2H\*0,5) ; 3,75 ( $\text{CH}_3$ -Glu, 3H\*0,5) ; 4,62 (NCHCO-Leu, 1H\*0,5) ; 4,70 (NCHCO-Glu, 1H\*0,5). Viscosité réduite (0,5 g/dl dans l'acide trifluoroacétique) à 25 °C = 2.2 dl/g.

35

ETAPE 2) : HYDROLYSE DE L'ESTER METHYLIQUE DU POLY(LEU-CO-GLU(OMe))  
50/50 :

- Le copolymère obtenu précédemment (17,7 g) est placé dans un réacteur dans lequel on rajoute 354 ml d'acide trifluoroacétique. Le milieu réactionnel est porté à 40 °C sous agitation. Lorsque le copolymère est totalement dissous, on rajoute 354 ml d'eau par petites quantités. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 48 h. Le polymère est récupéré par précipitation dans 5 l d'eau. Après filtration, il est à nouveau mis en suspension et agité dans l'eau pendant 0,5 h, puis filtré et essoré. La purification s'effectue par dialyse dans l'eau.
- 10 Rendement 15,9g (95 %). RMN <sup>1</sup>H (acide trifluoroacétique-d) : identique aux polymères de départ à une exception, le signal à 3,75 (CH<sub>3</sub>-Glu) est fortement diminué ou absent. Dans le cas présent, le taux d'esters résiduels est inférieur à 1 % par rapport aux monomères glutamate. Viscosité réduite (0,5 g/dl dans l'acide trifluoroacétique) à 25 °C = 0,95 dl/g.

15

EXEMPLE 2 :      SYNTHÈSE DU DIBLOC POLY(LEU-B-GLU(ONa)) 50/50.

- Dans un réacteur de 1 l, on introduit sous agitation 15,0 g de NCA-Glu(OMe) (0,08 mole) et 180 ml de dioxane. Après dissolution, on rajoute 180 ml de toluène et le milieu est porté à 60 °C. On effectue le spectre IR de la solution avant de rajouter 0,156 g de benzylamine (1,58 % molaire/NCA). Le milieu réactionnel se trouble rapidement et, au bout de 40 minutes, les bandes caractéristiques à 1 860 et 1 790 cm<sup>-1</sup> ont disparu.
- 20 Après une heure, on introduit une solution de 12,5 g de NCA-Leu (0,08 mole) dans un mélange dioxane/toluène (15 ml de chaque). L'agitation est poursuivie pendant 18 h (cette durée n'a pas été optimisée). Les bandes carbonyles ont alors disparu. On ajoute 100 ml de dioxane et le milieu réactionnel est homogénéisé pendant 1 h. Le copolymère est précipité dans 3 l d'éthanol absolu sous forte agitation. Il est lavé avec 1 l d'éthanol, filtré, essoré et enfin séché à 50 °C sous vide pendant une nuit.
- 30 La masse de produit récupérée est de 19,5 g (rendement = 95 %). RMN <sup>1</sup>H (acide trifluoroacétique-d) : 0,85 ppm (CH<sub>3</sub>-Leu, 6H\*0,5) ; 1,58 (CH<sub>2</sub> et CHMe<sub>2</sub> Leu, 3H\*0,5) ; 2,10 et 2,22 (CH<sub>2</sub>-Glu, 2H\*0,5) ; 2,58 (CH<sub>2</sub>-Glu ; 2H\*0,5) ; 3,75 (CH<sub>3</sub>-Glu, 3H\*0,5) ; 4,62 (NCHCO-Leu, 1H\*0,5) ; 4,70 (NCHCO-Glu, 1H\*0,5). Viscosité réduite (0,5 g/dl dans l'acide trifluoroacétique) à 25 °C = 0,62 dl/g.

35

La deuxième étape d'hydrolyse des esters méthyliques est identique à celle décrite dans l'exemple 1, étape 2. Rendement 95 %. RMN  $^1\text{H}$  (acide trifluoroacétique-d): identique aux polymères de départ à une exception, le signal à 3,75 ( $\text{CH}_3\text{-Glu}$ ) est fortement diminué ou absent. Dans le cas présent, le taux d'esters résiduels est inférieur à 1 % par rapport aux monomères glutamate. Viscosité réduite (0,5 g/dl dans l'acide trifluoroacétique) à 25 °C = 0,55 dl/g.

**EXEMPLE 3 :      SYNTHÈSE DU TRIBLOC POLY(GLU(ONA)-LEU-GLU(ONA))  
25/50/12.**

10

Dans un réacteur de 1 l, on introduit sous agitation 7,5 g de NCA-Glu(OMe) (0,04 mole) et 180 ml de dioxane. Après dissolution, on rajoute 180 ml de toluène et le milieu est porté à 60 °C. On effectue le spectre IR de la solution avant de rajouter 0,156 g de benzylamine.

15

Après la disparition totale du monomère, on introduit une solution de 12,5 g de NCA-Leu (0,08 mole) dans un mélange dioxane/toluène (15 ml de chaque). L'agitation est poursuivie pendant 18 h. Ensuite, on introduit à nouveau 7,5 g de NCA-Glu(OMe) (0,04 mole) qu'on permet de réagir pendant 12 heures. On ajoute 100 ml de dioxane et le milieu réactionnel est homogénéisé pendant 1 h.

20

Le copolymère est précipité dans 3 l d'éthanol absolu sous forte agitation. Il est lavé avec 1 l d'éthanol, filtré, essoré et enfin séché à 50 °C sous vide pendant une nuit.

La masse de produit récupéré est de 19,4 g (rendement = 95 %). RMN  $^1\text{H}$  (acide trifluoroacétique-d) : 0,85 ppm ( $\text{CH}_3\text{-Leu}$ , 6H\*0,5) ; 1,58 ( $\text{CH}_2$  et  $\text{CHMe}_2$  Leu, 3H\*0,5) ; 2,10 et 2,22 ( $\text{CH}_2\text{-Glu}$ , 2H\*0,37) ; 2,58 ( $\text{CH}_2\text{-Glu}$ , 2H\*0,37) ; 3,75 ( $\text{CH}_3\text{-Glu}$ , 3H\*0,37) ; 4,62 (NCHCO-Leu, 1H\*0,5) ; 4,70 (NCHCO-Glu, 1H\*0,37). Viscosité réduite (0,5 g/dl dans l'acide trifluoroacétique) à 25 °C = 0,58 dl/g.

25

La deuxième étape d'hydrolyse des esters méthyliques est identique à celle décrite dans l'exemple 1, étape 2. RMN  $^1\text{H}$  (acide trifluoroacétique-d) : identique aux polymère de départ à une exception, le signal à 3,75 ( $\text{CH}_3\text{-Glu}$ ) est fortement diminué ou absent. Dans le cas présent, le taux d'esters résiduels est inférieur à 1 % par rapport aux monomères glutamate. Viscosité réduite (0,5 g/dl dans l'acide trifluoroacétique) à 25 °C = 0,38 dl/g.

35

**EXEMPLE 4 :      MICROPARTICULES NEUTRES PREPAREES A PARTIR DE  
MIGLYOL®, D'EAU ET POLY LEUCINE-CO-GLUTAMATE DE  
SODIUM DE COMPOSITION 50/50 ET DE STRUCTURE RANDOM  
(STATISTIQUE).**

5

**4.1 - METHODOLOGIE :**

**4.1.1 - ÉTAPE a) : PREPARATION DU GEL :**

10

- On introduit, dans un tube à hémolyse, 50 mg de lyophilisat de polyleucine-co-glutamate de sodium (noté Leu/Glu), de composition 50/50, de structure statistique, synthétisé selon l'exemple 1 et de  $M_w$  de 110 000.
- On ajoute la phase aqueuse, typiquement 500 mg, qui peut être composée par de l'eau désionisée ou une solution saline tamponnée, par exemple du PBS 0,01 M (tampon phosphate, pH 7,4 à 25 °C).
- On laisse le lyophilisat de polyaminoacide s'hydrater pendant 2 heures à température ambiante.
- Le gel obtenu se présente sous la forme d'une solution colloïdale visqueuse diffusant dans le bleu.

15

**4.1.2 - ÉTAPES b) à e) : PREPARATION DES MICROPARTICULES :**

20

**(i) Procédé pour obtenir des PV dans une phase continue huileuse :**

25

30

35

- On introduit, dans le tube à hémolyse contenant le gel de polyaminoacide, 2 ml de la phase lipidique qui est composée d'huile de coco fractionnée, connue sous le nom commercial de Miglyol® (DYNAMIT NOBEL).
- On agite le mélange avec un homogénéisateur du type rotor/stator (ULTRA-TURRAX T8, TKA LABORTECHNIK). On obtient une dispersion d'aspect laiteux de microparticules dans une phase continue lipidique.
- Le tube à hémolyse, contenant la dispersion de microparticules, est centrifugé. La phase surnageante, composée de Miglyol® excédentaire, est séparée du sédimentat par simple écoulement. On recueille ainsi 1 340 mg d'huile.
- Le sédimentat est redispersé dans de l'eau désionisée, contenant un bactériostatique : le Thimérosal® (50 µg/ml), ou dans une solution saline tamponnée, par exemple du PBS 0,01 M (tampon phosphate, pH

7,4 à 25 °C) contenant du Thimérosal® (50 µg/ml). Le volume total de la dispersion obtenue est de 5 000 µl.

(ii) Procédé pour obtenir des PV dans une phase continue aqueuse :

- 5 • On introduit, dans le tube à hémolyse contenant le gel de polyaminoacide, 400 ± 2 µl de la phase lipidique qui est composée d'huile de coco fractionnée connue sous le nom commercial de Miglyol® (DYNAMIT NOBEL).
- 10 • On agite le mélange avec un homogénéisateur du type rotor/stator (ULTRA-TURRAX T8, IKA LABORTECHNIK). On obtient une dispersion très dense laiteuse de microparticules dans une phase continue eau.
- 15 • La dispersion est alors diluée dans de l'eau désionisée contenant du Thimérosal® (50 µg/ml), ou dans une solution saline tamponnée, par exemple du PBS 0,01 M (tampon phosphate, pH 7,4 à 25 °C) contenant du Thimérosal® (50 µg/ml). Le volume total de la dispersion obtenue est de 5 000 µl.

#### 4.2 - CARACTERISATION DES MICROPARTICULES :

- 20 • La composition globale des microparticules avant redispersion est :
  - \* 4 % en polyaminoacide,
  - \* 53 % en Miglyol®,
  - \* 43 % d'eau ou de solution saline.
- 25 • La répartition granulométrique des microparticules est mesurée par diffraction laser. L'appareil utilisé est un COULTER LS 130. Le modèle de calcul choisi est le modèle de FRAUNHOFER avec "PIDS". L'histogramme de répartition volumique est donné en fig. 3. Le profil est monomodal, le diamètre moyen de référence D[4,3] est de 2,8 µm avec un écart type (SD) de 1,1 µm.

Exprimée différemment, la répartition granulométrique est la suivante :

30

% de PV :	10,00	25,00	50,00	75,00	90,00
Taille en µm inférieure à :	5,165	3,876	2,730	1,901	1,394

- Les microparticules ont été observées en microscopie électronique à balayage (MEB) en platine froide. Les photographies sont données **fig. 1**.
- Les microparticules conservent leur identité et leur intégrité dans les solvants, tels que l'acétone, le diméthylsulfoxyde, l'éthanol et dans des milieux aqueux dans la gamme de pH comprise entre pH = 2 et pH = 13.

5      • **Test  $\alpha_1$  : Lyophilisation/réhydratation :**

La suspension, diluée dans 50 ml, est lyophilisée pendant 48 h. On récupère 529 mg de lyophilisat de microparticules. La réhydratation de la totalité du lyophilisat dans 5 ml de PBS conduit, spontanément, à une suspension de microparticules présentant un profil granulométrique, monomodal, similaire à celui des microparticules avant lyophilisation (cf. **fig. 4**). Le diamètre moyen volumique, D[4,3], est de 2,9  $\mu\text{m}$  et l'écart type de 2  $\mu\text{m}$ , soit un  $\Delta$  de 3,5 % par rapport au D[4,3] de référence.

15      • **Test  $\alpha_1$  : résultats :**

% de PV :	10	25	50	75	90
Taille en $\mu\text{m}$ inférieure à :	0,907	1,385	2,322	3,873	5,816

20      • **Test  $\alpha_2$  :**

On trouve un D[4,3] de 3  $\mu\text{m}$  avec une estimation de l'écart type de 2  $\mu\text{m}$ , soit un  $\Delta$  de 7,1 % par rapport au D[4,3] de référence.

• **Test  $\alpha_3$  :**

\* à pH 2, on mesure un D[4,3] de 3,9  $\mu\text{m}$  avec un SD de 2,9  $\mu\text{m}$ , soit un  $\Delta$  de 3,5 % par rapport au D[4,3] de référence,

25      \* à pH 13, on mesure un D[4,3] de 3,0  $\mu\text{m}$  avec un SD de 2,2  $\mu\text{m}$ , soit un  $\Delta$  de 7,1 % par rapport au D[4,3] de référence.

• **Test  $\alpha_4$  :**

La stabilité de forme des microparticules stockées en dispersion aqueuse ou bien saline, à 4 °C, 37 °C et à température ambiante, est analysée par un suivi de la granulométrie des microparticules. On considère les microparticules physiquement stables lorsque la modification enregistrée du diamètre moyen D[4,3] n'excède pas plus de 20 % du D[4,3] initial.

*Test  $\alpha_s$  : résultats :*

Température de stockage	4 °C	T ambiante	37 °C
Stab. en dispersion aqueuse		> 1 an	
Stab. en dispersion saline	> 6 mois		> 3 mois

5 **EXEMPLE 5 :** NANOPARTICULES NEUTRES PREPAREES A PARTIR DE MIGLYOL®, D'EAU ET DE POLY LEUCINE-CO-GLUTAMATE DE SODIUM DE COMPOSITION 50/50 ET DE STRUCTURE RANDOM .

## 5.1- METHODOLOGIE :

## 5.1.1 - ETAPE a) : PREPARATION DU GEL :

- 10 • On procède selon l'exemple 4.1.1 en mettant en oeuvre une masse de 150 mg du polyaminoacide cité précédemment. La phase aqueuse, est alors typiquement de 1 350 mg.

## 5.1.2 - ETAPE b) à e) : PREPARATION DE NANOPARTICULES :

- 15 • On introduit dans le tube à essai contenant le gel de polyaminoacide 1 200µl de Miglyol®.
- On agite le mélange avec un homogénéisateur du type rotor/stator (ULTRA-TURRAX T8, IKA LABORTECHNIK). On obtient ainsi une suspension aqueuse concentrée et visqueuse de microcapsules.
- 20 • On dilue cette suspension dans un volume total de 15 ml d'eau désionisée ou de solution isotonique tamponnée phosphate à pH 7,4.
- On introduit la suspension diluée de microparticules dans le réservoir d'un homogénéiseur haute pression de type Microfluidizer M-110S de marque MICROFLUIDICS.
- 25 • On pratique une homogénéisation de la suspension diluée de microparticules pendant 10 min, en appliquant une pression d'entrée sur la pompe de l'ordre de 5 bars.
- On recueille alors, par vidange du réservoir, une suspension de nanoparticules.

## 30 5.2 - CARACTERISATION DES NANOPARTICULES :

- La composition globale des nanoparticules avant dilution est : 6 % en polyaminoacide ; 43 % en Miglyol® ; 51 % d'eau ou de solution saline.



- 5 • La répartition granulométrique des microparticules est mesurée par diffraction laser. L'appareil utilisé est un COULTER LS130 ; le modèle de calcul choisie est le modèle de Psl O.M.D included "PIDS". L'histogramme de répartition volumique est donné en fig. 5. Le diamètre moyen de référence D[4.3] est de 0,420  $\mu\text{m}$  avec un écart type de 0,37  $\mu\text{m}$ .

% de PV :	10	25	50	75	90
Taille en $\mu\text{m}$ inférieure à :	0,191	0,242	0,321	0,434	0,592

- 10 • **Test  $\alpha_2$  :**  
On obtient un D[4,3] de 0,45  $\mu\text{m}$  et un SD de 0,41  $\mu\text{m}$ , soit un  $\Delta$  de 7,1 % par rapport au D[4,3] de référence.

15 **EXEMPLE 6 : MICROPARTICULES NEUTRES PREPAREES A PARTIR DE MIGLYOL®, D'EAU ET POLY LEUCINE-CO-GLUTAMATE DE SODIUM DE COMPOSITION 50/50 ET DE STRUCTURE DIBLOC.**

#### 6.1 - METHODOLOGIE :

##### 6.1.1 - ETAPE a) : PREPARATION DU GEL :

- 20 • On introduit, dans un tube à hémolyse, 146 mg de lyophilisat de poly leucine-co-glutamate de sodium (noté LEU/GLU) synthétisé selon l'exemple 2.
- 25 • On ajoute la phase aqueuse, typiquement  $702 \pm 0,2$  mg, qui peut être composée par de l'eau désionisée filtrée à 0,22  $\mu\text{m}$ , ou une solution saline tamponnée, par exemple du PBS 0,01 M (Solution isotonique, tamponnée phosphate à pH 7,4 à 25 °C ).
- On laisse le lyophilisat de polyaminoacide s'hydrater.
- Le gel obtenu se présente sous la forme d'une solution colloïdale visqueuse diffusant fortement dans le blanc.

##### 6.1.2 - ETAPES b) à e) : PREPARATION DES MICROCAPSULES :

- 30 • On procède ensuite comme dans l'exemple 4.1.2(i) Après centrifugation, on recueille 1 518 mg d'huile.

## 6.2 - CARACTERISATION DES MICROCAPSULES :

- La composition globale des microparticules avant redispersion est : 12 % en polyaminoacide ; 31 % en Miglyol® ; 57 % d'eau ou de solution saline.
- La répartition granulométrique des microparticules est mesurée par diffraction laser. L'appareil utilisé est un COULTER LS130 ; le modèle de calcul choisi est le modèle de FRAUNHOFER incluant "PIDS". L'histogramme de répartition volumique est donné en fig. 6. Le profil est monomodal, le diamètre moyen de référence  $D[4,3]$  est de 1,9  $\mu\text{m}$  avec un écart type de 1,2  $\mu\text{m}$ .

% de PV :	10	25	50	75	90
Taille en $\mu\text{m}$ inférieure à :	0,801	1,096	1,605	2,433	3,678

- Les microparticules ont été observées en MEB en platine froide. Les photographies sont données en fig. 2.
- **Test  $\alpha_4$  :**  
On obtient un  $\Delta$  de  $D[4,3]$  inférieur ou égal à 10 % par rapport au  $D[4,3]$  de référence.

**Test  $\alpha_4$  - Résultats :**

Température de stockage	4 °C	T ambiante	37 °C
Stabilité en dispersion saline	$\geq 18$ mois	$\geq 12$ mois	$\geq 3$ mois

**EXEMPLE 7 :** MICROPARTICULES NEUTRES PREPAREES A PARTIR DE MIGLYOL®, D'EAU ET POLY LEUCINE-CO-GLUTAMATE DE SODIUM DE COMPOSITION 30/70 ET DE STRUCTURE RANDOM.

## 7.1 - METHODOLOGIE :

## 7.1.1 - ETAPE a) : PREPARATION DU GEL :

- On introduit, dans un tube à hémolyse, 100 mg de lyophilisat de poly leucine-co-glutamate de sodium (noté LEU/GLU) de composition 30/70,

synthétisé selon le protocole donné à l'exemple 1 en modifiant le ratio des monomères.

- On ajoute la phase aqueuse, typiquement 400 mg, de PBS 0,01 M (solution isotonique, tamponnée phosphate à pH 7,4 à 25 °C ).
- On laisse le lyophilisat de polyaminoacide s'hydrater.
- Le gel obtenu se présente sous la forme d'une solution colloïdale visqueuse diffusant dans le bleu.

7.1.2 - ÉTAPE b) à e) : PRÉPARATION DES MICROCAPSULES :

- On procède tel que décrit dans l'exemple 4.1.2(i). Après centrifugation, on recueille 1 620 mg d'huile.

7.2 - CARACTERISATION DES MICROCAPSULES :

- La composition globale des microparticules avant redispersion est : 12% en polyaminoacide ; 38% en Miglyol ®; 50 % de solution saline.
- La répartition granulométrique des microparticules, mesurée par diffraction laser dans les conditions standard stipulées dans l'exemple 4, donne un diamètre moyen de référence  $D[4,3]$  de 2,9  $\mu\text{m}$  avec un écart type de 1,5  $\mu\text{m}$  (cf. fig. 8, courbe 1).

LYOPHILISATION/REHYDRATATION :

- **Test  $\alpha_1$  :**

La dispersion de microparticules, ainsi obtenues et caractérisées, est lyophilisée pendant 48 heures. On récupère 212 mg de lyophilisat de microparticules. La réhydratation de la totalité de ce lyophilisat dans 5 ml de PBS, conduit, spontanément, à une suspension de microparticules présentant un profil granulométrique quasiment superposable à celui d'avant l'étape de lyophilisation. Le  $D[4,3]$  est de 3,0  $\mu\text{m}$  avec un écart type de 1,8  $\mu\text{m}$ . (cf. fig. 7, courbe 2), soit un  $\Delta D[4,3]$  par rapport au  $D[4,3]$  de référence à 3,4 %.

**EXEMPLE 8 :      MICROPARTICULES NEUTRES PREPAREES A PARTIR D'HUILE DE  
SILICONE D'EAU ET POLY LEUCINE-CO-GLUTAMATE DE SODIUM  
DE COMPOSITION 30/70 ET DE STRUCTURE RANDOM.**

5    8.1 - METHODOLOGIE :

8.1.1 - ETAPE A) : PREPARATION DU GEL :

- On introduit dans un tube à hémolyse 50 mg de lyophilisat de poly leucine-co-glutamate de sodium (noté LEU/GLU) de composition 30/70, synthétisé selon le protocole donné à l'exemple 1 en modifiant le ratio des monomères.
- On ajoute la phase aqueuse, typiquement 450 mg, de PBS 0,01 M (solution isotonique, tamponnée phosphate à pH 7,4 à 25 °C).
- On laisse le lyophilisat de polyaminoacide s'hydrater.
- Le gel obtenu se présente sous la forme d'une solution colloïdale visqueuse diffusant dans le bleu.

8.1.2 - ETAPE b) à e) : PREPARATION DES MICROCAPSULES :

- On introduit dans le tube à hémolyse contenant le gel de polyaminoacide 2 000 µl d'huile de silicone de référence Rhodorsil® 47V20.
- On agite le mélange avec un homogénéisateur du type rotor/stator (ULTRA-TURRAX T8, IKA LABORTECHNIK). On obtient une dispersion d'aspect laiteux de microparticules dans une phase continue huileuse.
- Le tube à hémolyse, contenant la dispersion de microparticules, est centrifugé (20 min à 3 500 tr/min). La phase surnageante, composée d'huile de silicone excédentaire, est séparée du sédimentat par simple écoulement ; on recueille ainsi 921 mg d'huile.
- Le sédimentat est redispersé dans de l'eau désionisée contenant du Thimérosal® (50 µg/ml), ou dans une solution saline tamponnée, par exemple du PBS 0,01 M (tampon phosphate, pH 7,4 à 25 °C) contenant du Thimérosal® (50 µg/ml). Le volume total de la dispersion obtenue est de 5 000 µl.

8.2 - CARACTERISATION DES MICROCAPSULES :

- La composition globale des microparticules avant redispersion est : 3,3 % en polyaminoacide ; 66,6 % de Rhodorsil® ; 30,1% de solution saline.

- La répartition granulométrique des microparticules, mesurée par diffraction laser dans les conditions standard stipulées dans l'exemple 4, donne un diamètre moyen  $D[4,3]$  qui est de  $4,7 \mu\text{m}$  avec un écart type de  $1,7 \mu\text{m}$ .

**5 EXEMPLE 9 : MICROPARTICULES NEUTRES PREPAREES A PARTIR D'HUILE DE DIFFERENTES NATURES D'EAU ET POLY LEUCINE-CO-GLUTAMATE DE SODIUM DE COMPOSITION 50/50 ET DE STRUCTURE RANDOM.**

**10 9.1 - METHODOLOGIE :**

On procède comme indiqué dans l'exemple 8 et on met en oeuvre les huiles suivantes :

ESSAI	NOM USUEL	NOM COMMERCIAL	FOURNISSEUR
1	alcool oléique	NOVOL	CRODA
2	triglycéride d'acides eicosapentanoïque docosahexanoïque	INCROMEGA TG	CRODA
3	triglycéride d'acides capriliques capriques	MIGLYOL	HULS
4	triglycéride d'acides capriliques	TRICAPRYLIN C8	SIGMA
5	triglycéride d'acides capryliques triglycérides	CRODAMOL GTCC	CRODA
6	benzoate d'alkyle	CRODAMOL AB	CRODA
7	palmitate d'isopropyle	CRODAMOL IPP	CRODA
8	stéarate de butyle	CRODAMOL BS	CRODA
9	esters d'acides eicosapentanoïques docosahexanoïques	INCROMEGA E	CRODA
10	oléate d'éthyle	ETHYL OLEATE	CRODA
11	huile de paraffine	coupe C16/C21	MOREL/SALABE
12	huile de silicone	RHODORSIL 47V100	RHONE POULENC
13	huile d'olive	REFINED OLIVE OIL	CRODA
14	acides eicosapentanoïques docosahexanoïques	INCROMEGA F	CRODA

**15 9.2 - CARACTERISATION DES MICROCAPSULES :**

- La composition globale des microparticules, avant redispersion, varie selon les phases lipidiques utilisées, dans les intervalles suivants : 3 à 4 % en polyaminoacide ; 64 à 69 % huile, 28 à 32 % d'eau ou de solution saline.

Seules les microparticules à base d'INCROMEGA E affichent une composition différente avant redispersion : 5 % en polyaminoacide ; 51 % huile ; 44 % d'eau ou de solution saline.

- Les répartitions granulométriques des microparticules sont mesurées par diffraction laser. L'appareil utilisé est un COULTER LS130 ; le modèle de calcul choisi est le modèle de FRAUNHOFER incluant "PIDS". Les diamètres moyens volumiques,  $D[4,3]$ , et les écarts types obtenus sont reportés sur le graphe de la fig. 8.

#### 10 EXEMPLE 10 : MICROPARTICULES NEUTRES PREPAREES A PARTIR DE MIGLYOL®, D'EAU ET DE DIFFERENTS COPOLY $\alpha$ -AMINOACIDES DE STRUCTURE RANDOM.

##### 10.1 - METHODOLOGIE :

- On procède comme mentionné dans l'exemple 4.1.1 et 4.1.2(i). Les copoly  $\alpha$ -aminoacides mis en oeuvre sont ceux donnés dans le tableau ci-dessous. Le temps d'hydratation du lyophilisat de polymère dans la solution isotonique (PBS 0,01M tamponnée à pH 7,4) est de 24 heures. Les gels obtenus présentent des viscosités différentes.

N°	COPOLY $\alpha$ AMINOACIDES	FOURNISSEUR
1	Poly (Glu ; Phe) 80/20	SIGMA
2	Poly (Glu/Leu) 80/20	SIGMA
3	Poly (Glu/Tyr) 50/50	SIGMA
4	Poly (Glu/Leu) 25/75	FLAMEL TECHNOLOGIES
5	Poly (Orn/Leu) 50/50	SIGMA

##### 10.2 - CARACTERISATION DES MICROPARTICULES :

- La composition globale des microparticules, avant redispersion, varie selon les polymères utilisés, dans les intervalles suivants :

N°	% EAU	% MYGLIOL	% POLYMERÉ
1	20	77	3
2	33	62	5
3	51	43	6
4	39	56	5
5	27	68	5

- 5 • Les répartitions granulométriques des microparticules sont mesurées par diffraction laser. L'appareil utilisé est un COULTER LS130 ; le modèle de calcul choisi est le modèle de FRAUNHOFER inclued "PIDS". Les diamètres moyens volumiques, D[4,3], et les écarts types (SD) obtenus sont reportés sur le tableau suivant :

N°	D[4,3] $\mu\text{m}$	SD $\mu\text{m}$	PROFIL DE REPARTITION
1	5,5	3,6	Monomodale
2	8,8	8,6	Bimodale
3	155,5	114	Monomodale
4	5,9	3,9	Monomodale
5	9,7	11,0	Bimodale

- 10 • Les microparticules des lots 1 à 5 satisfont au test  $\alpha_2$ .

15 **EXEMPLE 11 :** MICROPARTICULES CONTENANT DU CYTOCHROME, PREPAREES A PARTIR DE MIGLYOL®, D'EAU ET DE POLY LEUCINE-CO-GLUTAMATE DE SODIUM DE COMPOSITION 50/50 ET DE STRUCTURE RANDOM - ENCAPSULATION PAR VOIE DIRECTE.

#### 11.1 - METHODOLOGIE :

Trois lots de microcapsules ont été fabriquées selon des conditions opératoires identiques décrites ci-dessous.

*11.1.1 - ETAPE a) : PREPARATION DU GEL :*

- On prépare 1,5 ml d'une solution mère de cytochrome C coeur de cheval (ref. C2506 SIGMA) à 60 mg/ml dans un tampon phosphate isotonique (PBS) 0,01 M , pH 7,4.
- 5     • On introduit, dans un tube à hémolyse,  $50 \pm 0,2$  mg de lyophilisat de poly leucine-co-glutamate de sodium (noté LEU/GLU) de composition 50/50, de structure random et de  $M_w$  de 110 000.
- On ajoute 450 mg de la solution mère de cytochrome,
- On laisse le lyophilisat de polyaminoacide s'hydrater.
- 10    • Le gel obtenu se présente sous la forme d'une solution colloïdale visqueuse rouge/orangé.

*11.1.2 - ETAPES b) à e) : PREPARATION DES MICROCAPSULES SELON PROTOCOLE EXEMPLE 4.1.2(i) :*

- On introduit, dans le tube à hémolyse contenant le gel de polyaminoacide et de cytochrome, 2 000  $\mu$ l de Miglyol® (DYNAMIT NOBEL).
- 15    • On agite le mélange avec un homogénéisateur du type rotor/stator (ULTRA-TURRAX T8, IKA LABORTECHNIK). On obtient une dispersion d'aspect laiteux de microparticules dans une phase continue lipidique.
- 20    • Le tube à hémolyse, contenant la dispersion de microparticules, est centrifugé. La phase surnageante, composée de Miglyol® excédentaire, est séparée du sédimentat par simple écoulement. On recueille ainsi 1 577 mg d'huile.
- Le sédimentat est redispersé dans du PBS filtrée à  $0,22 \mu$ m contenant du
- 25    Thimérosal® (50  $\mu$ g/ml). Le volume total de la dispersion obtenue est de 20 ml. •Stockage de la dispersion de microparticules dans une enceinte ventilée, conditionnée à la température de 37 °C.

*11.2 - CARACTERISATION DES MICROPARTICULES :*

- 30    • La composition globale des trois lots de microparticules avant redispersion varie de :  $5 \pm 1$  % en polyaminoacide ;  $39 \pm 3$  % en Miglyol® ;  $55 \pm 3$  % en PBS.
- La répartition granulométrique des microparticules, mesurée par diffraction laser sur un COULTER LS130 en mode FRAUNHOFER included "PIDS",
- 35    est monomodale pour les trois lots, avec un diamètre moyen volumique  $D[4,3]$  de  $2,4 \pm 0,5 \mu$ m et un écart type de  $1,1 \pm 0,4 \mu$ m.



### 11.3 - ETUDE DE RELARGAGE :

Pour l'étude de relargage on procède par filtration, à un temps donné, d'un volume connu de dispersion de microparticules. Le filtrat est ensuite analysé par HPLC, pour doser le cytochrome non encapsulé ou relargué. Les filtrations ont été réalisées à T<sub>0</sub> puis après 3 heures, 5 heures, 17 heures, 24 heures et 5 jours de stockage à 37 °C.

- *CONDITIONS DE FILTRATION :*

- Cellule de diafiltration à agitation de type AMICON de 50 ml de capacité.
- Membrane de type polysulfone (réf. XM 300, AMICON).

- *CONDITIONS DE DOSAGE :*

- HPLC à séparation par affinité sur colonne PLRPS (300 Å).

- *RESULTATS :*

- Les rendements d'encapsulation, définis comme le rapport de la quantité de cytochrome encapsulé sur la quantité de cytochrome initialement introduite, sont de 100 %, pour un taux d'encapsulation de 35 % de cytochrome/polymère.
- On n'observe aucun relargage R de cytochrome dans le milieu de dispersion, après 5 jours de stockage à 37 °C (cf. fig. 9).

**EXEMPLE 12 :    MICROPARTICULES    CONTENANT    DU    CYTOCHROME,  
PREPAREES A PARTIR DE MIGLYOL®, D'EAU ET DE POLY  
LEUCINE-CO-GLUTAMATE DE SODIUM DE COMPOSITION 50/50  
ET DE STRUCTURE RANDOM - ENCAPSULATION PAR AUTO  
ASSOCIATION.**

### 12.1 - METHODOLOGIE :

Un lot de microcapsules a été fabriqué selon les conditions opératoires décrites dans l'exemple 4.1.1 et 4.1.2(i). Le sédimentat de microparticule est alors dispersé dans un volume de 10 ml de solution isotonique tamponné phosphate à pH 7,4 contenant 1,0 mg/ml de cytochrome C cœur de cheval. Après un temps de contact de 24 h à température ambiante, la dispersion de microcapsules est filtrée selon les conditions données dans l'exemple 11. L'analyse HPLC révèle une concentration en cytochrome libre présent dans le filtrat de 0,5 mg/ml.

## 12.2 - RESULTAT :

Le taux d'encapsulation en cytochrome est de 10 % par rapport au polymère, pour un rendement d'encapsulation de 50%.

5

**EXEMPLE 13 :**    **MICROPARTICULES CONTENANT UNE PROTEINE ANTIGENIQUE DE LA MALADIE DE LYME "OSP A", PREPAREES A PARTIR DE MIGLYOL®, D'EAU ET DE POLY EUCINE-CO-GLUTAMATE DE SODIUM DE COMPOSITION 50/50 ET DE STRUCTURE RANDOM.: ENCAPSULATION PAR VOIE DIRECTE.**

10

## 13.1 - METHODOLOGIE :

13.1.1 - *ETAPE a) : PREPARATION DU GEL :*

- On introduit dans un tube à hémolyse 50 mg de lyophilisat de poly leucine-co-glutamate de sodium (noté LEU/GLU) synthétisé selon l'exemple 1.
- On ajoute 450 mg d'une solution aqueuse contenant 4,4 mg/ml d'Osp A.

15

13.1.2 - *ETAPES b) à e) : PREPARATION DES MICROCAPSULES :*

- On effectue ces étapes de la même façon que celle décrite pour le procédé de l'exemple 4.1.2(i).

20

*FILTRATION :*

- Un volume de 2 ml de dispersion de microcapsules est introduit dans un tube d'ultrafiltration de type ULTRAFREE XM300, commercialisé par MILLIPORE.
- Après centrifugation, on recueille 1 ml de filtrat que l'on analyse par dosage ELISA.

25

## 13.2 - RESULTAT :

- Le dosage ELISA révèle une concentration d'Osp A, non encapsulée, dans le filtrat de 0,21 mg/ml.
- Le taux d'encapsulation en Osp A est de 0,36% par rapport au polymère, pour un rendement d'encapsulation de 46 %.

30

35

5 **EXEMPLE 14 :** MICROPARTICULES CONTENANT UNE GLYCOPROTEINE ANTIGENIQUE DE LA MALADIE DE L'HERPES "gD2t", PREPAREES A PARTIR DE MIGLYOL®, D'EAU ET DE POLYLEUCINE-CO-GLUTAMATE DE SODIUM DE COMPOSITION 50/50 ET DE STRUCTURE RANDOM - ENCAPSULATION PAR VOIE DIRECTE.

14.1 - METHODOLOGIE :

10 14.1.1 - ETAPE a) : PREPARATION DU GEL :

- On introduit, dans un tube à hémolyse, 50 mg de lyophilisat de poly leucine-co-glutamate de sodium (noté LEU/GLU) selon l'exemple 1.
- On ajoute  $450 \pm 0,2$  mg d'une solution aqueuse contenant 0,666 mg/ml de gD2t.

15 14.1.2 - ETAPES b) à e) : PREPARATION DES MICROCAPSULES :

- On effectue ces étapes de la même façon que décrite pour le procédé avec inversion d'émulsion de l'exemple 4.1.2(i).

FILTRATION :

- 20
- Un volume de 2 ml de dispersion de microcapsules est introduit dans un tube d'ultrafiltration de type ULTRAFREE XM300, commercialisé par MILLIPORE.
  - Après centrifugation, on recueille 1 ml de filtrat que l'on analyse par dosage ELISA.

25 14.2 - RESULTATS :

- Le dosage ELISA révèle une concentration de gD2t, non encapsulée, dans le filtrat de 5 µg/ml.
- Le taux d'encapsulation "gD2t" est de 0,12% par rapport au polymère, pour un rendement d'encapsulation de 92 %.

**REVENDECATIONS :**

1 - Microparticules susceptibles d'être utilisées comme vecteurs de principe(s) actif(s) (PA), caractérisées :

- 5                   \*  $\alpha$  \* en ce qu'elles ont chacune une structure cohésive faite de gel-composite, physico-chimiquement stable et intègre,
- \*  $\beta$  \* en ce qu'elles tirent leur cohésion de la présence des trois composés suivants :
- (I) de l'huile,
- (II) une phase aqueuse,
- 10                  (III) et au moins un copolyaminoacide linéaire non réticulé, synthétique et comportant au moins deux types différents de comonomères aminoacides AA<sub>i</sub> hydrophile et AA<sub>o</sub> hydrophobe,
- \*  $\gamma$  \* et en ce qu'elles présentent une taille moyenne contrôlable et
- 15                  ajustable sur une gamme inférieure ou égale à 500  $\mu$ m, de préférence à 200  $\mu$ m et, plus préférentiellement, comprise entre 0,05 et 100  $\mu$ m.

2 - Microparticules selon la revendication 1, caractérisées en ce que leurs caractéristiques \*  $\alpha$  \* sont reflétées par au moins l'une des propriétés fonctionnelles

20   suivantes :

- $\alpha_1$  - absence de coalescence des microparticules suite à un traitement de lyophilisation, cette non-coalescence se traduisant par une conservation de la répartition granulométrique, en particulier du D[4,3] à raison de  $\pm 20$  %, après réhydratation selon un test  $\alpha_1$  ;
- 25                  -  $\alpha_2$  - absence de coalescence à la centrifugation se traduisant par une conservation de la répartition granulométrique et, en particulier du D[4,3] à raison de  $\pm 20$  %, selon un test  $\alpha_2$  ;
- $\alpha_3$  - résistance aux variations de pH se traduisant par une conservation de la répartition granulométrique des
- 30                  microparticules et, en particulier, du D[4,3] à raison de  $\pm 20$  %, après soumission à des pH de 2 à 13, selon un test  $\alpha_3$  ;
- $\alpha_4$  - absence de coalescence en dispersion dans une solution saline tamponnée, se traduisant par une conservation de la répartition granulométrique des microparticules, en particulier de leur
- 35                  D[4,3] à raison de  $\pm 20$  %, pendant des durées de stockage

supérieures ou égales à 3, 9 et 18 mois à des températures de 37 °C, ambiante et 4 °C, respectivement, selon un test  $\alpha_4$ .

3 - Microparticules selon la revendication 1 ou 2, caractérisées en ce que le copolyaminoacide (III) présente :

- 5                   \* des comonomères  $AA_i$  choisis dans le groupe d'acides aminés suivants : acide glutamique, acide aspartique, ornithine, arginine, lysine, asparagine, histidine et leurs mélanges,
- \* ainsi que des comonomères  $AA_o$  choisis dans le groupe d'acides aminés suivants : leucine, tyrosine, phénylalanine, valine, cystine, isoleucine et leurs mélanges.

4 - Microparticules selon la revendication 3, caractérisées en ce que  $AA_i = \text{Glu et/ou Asp et } AA_o = \text{Leu et/ou Leu, et/ou Tyr et/ou Phe}$ .

5 - Microparticules selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en ce que le copolyaminoacide (III) est de structure statistique ou de structure dibloc, tribloc ou multibloc.

6 - Microparticules selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisées en ce que le copolyaminoacide (III) est soit multibloc et possède une masse molaire  $M_w$  supérieure ou égale à 5 000 D, de préférence comprise entre 5 000 et 100 000 D et, plus préférentiellement encore, entre 5 000 et 20 000 D, soit random (statistique) et possède une masse molaire  $M_w$  supérieure ou égale à 50 000 D, de préférence comprise entre 10 000 et 300 000 D et, plus préférentiellement encore, comprise entre 10 000 à 100 000 D.

7 - Microparticules selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisées en ce que l'huile (I) est formée par un ou plusieurs composés gras sélectionnés dans le groupe suivant :

- \* triglycéride(s) d'acide d'ester gras à chaînes moyennes d'origine animale, végétale ou synthétique,
- \* paraffine(s),
- \* huile(s) polysiloxane(s),
- \* acides gras d'origine animale ou végétale,
- \* esters acides gras, leurs esters et/ou leurs sels.

8 - Microparticules selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisées en ce que la phase aqueuse (II) est constituée par une solution saline, de préférence tamponnée.

9 - Microparticules selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisées par la composition suivante :

- (I) triglycéride(s) d'acide d'ester gras à chaînes moyennes, l'huile de coco étant particulièrement préférée,
- (II) eau déionisée ou solution saline tamponnée, le pH de cette phase aqueuse étant compris entre 6 et 8,
- (III) copolyaminoacide de type Leu/Glu, de préférence 50/50.

5

10 - Procédé de préparation de microparticules, notamment du type de celles selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend, essentiellement, les étapes suivantes, successives ou non :

10

- a - préparation d'un gel à partir de la phase aqueuse (II) et d'au moins un copolyaminoacide (III), (II) et (III) étant tels que définis dans les revendications 1 à 9,

- b - mise en présence du gel issu de l'étape - a - avec de l'huile (I), telle que définie dans les revendications 1 et/ou 7,

15

- c - agitation du mélange gel + (I) conduisant à une dispersion de microparticules dans une phase continue huileuse ou aqueuse (I),

- d - éventuelle séparation des microparticules et de la phase continue huileuse ou aqueuse, de préférence par centrifugation,

- e - éventuelle redispersion des microparticules recueillies à l'issue de l'étape - e - dans un liquide de stockage,

20

- f - éventuel traitement de lyophilisation des microparticules de l'étape - d -, redispersées ou non.

25

11 - Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'étape - a - consiste à mélanger la phase aqueuse (II) et le (ou les) copolyaminoacide(s) (III) dans des proportions telles que (III) représente de 2 à 50 %, de préférence de 5 à 30 % en poids du gel (III) + (II).

12 - Procédé selon la revendication 10 ou la revendication 11, caractérisé en ce que l'on prévoit d'introduire de l'huile (I) dans le mélange de l'étape - b -, au cours de l'étape - c -.

30

13 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que l'agitation - c - est réalisée à l'aide d'un dispositif rotor/stator et en mettant en oeuvre une vitesse d'agitation comprise entre 1 000 et 40 000, de préférence 5 000 et 25 000 tr/min.

35

14 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il s'effectue à température ambiante comprise, de préférence, entre 10 et 35 °C.

15 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 14, caractérisé en ce que l'on incorpore au moins un PA dans l'huile (I) et/ou dans la phase aqueuse (II) et/ou dans le PAA (III) et/ou dans le gel (II) + (III) de l'étape - a -, de façon à obtenir des microparticules chargées en PA.

5 16 - Microparticules selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 et/ou obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 15,

caractérisées en ce que le principe actif est médicamenteux et, de préférence, choisi parmi :

10 \* les protéines et/ou les peptides parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les antigènes, les anticorps, la caltonine, l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, le facteur IX, l'interleukine ou leurs mélanges,

15 \* les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée,

\* les acides nucléiques et, préférentiellement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN,

\* et leurs mélanges.

20 17 - Microparticules selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 et/ou obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 15, caractérisées en ce que le principe actif est constitué par au moins un vaccin.

25 18 - Spécialité pharmaceutique pour administration, de préférence, par voie orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou parentérale,

caractérisée en ce qu'elle comporte des particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, 16 et 17 et/ou obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 15.

30 19 - Microparticules selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 et/ou obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 15, caractérisées en ce que le principe actif est un produit phytosanitaire ou cosmétique.

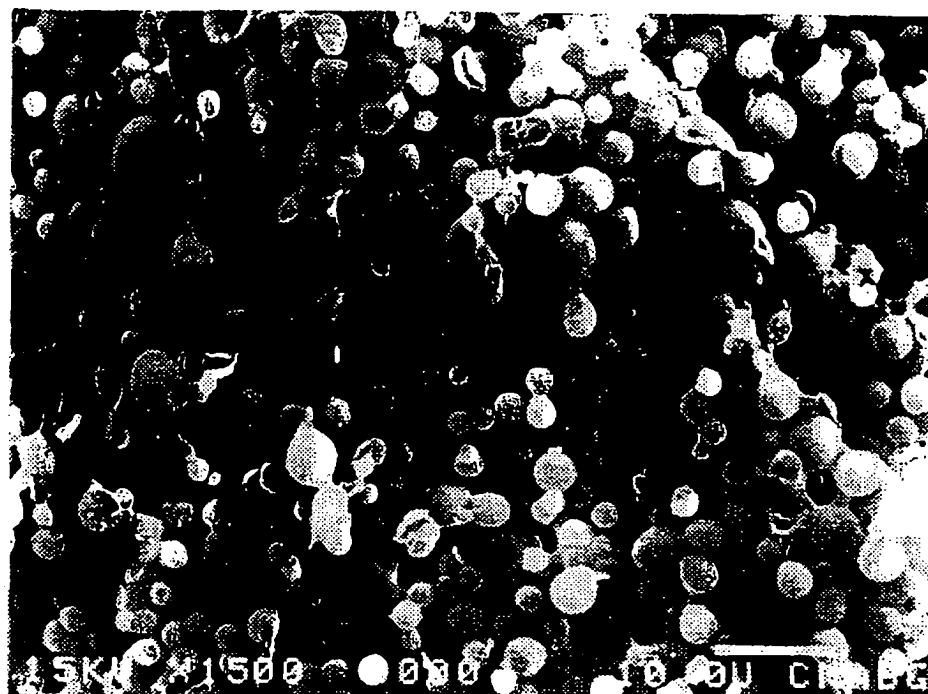


FIG.1

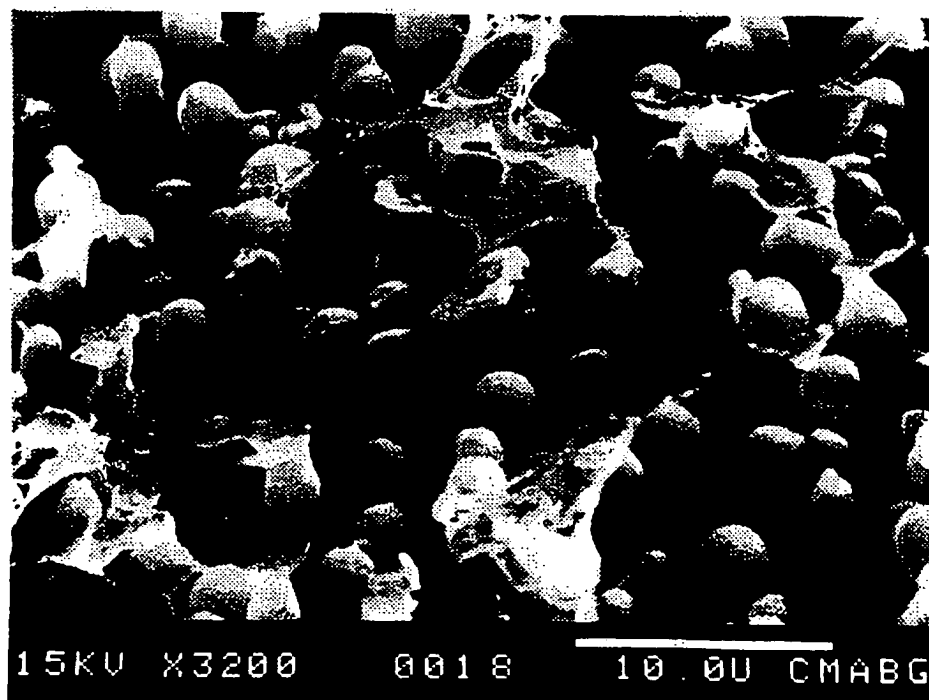
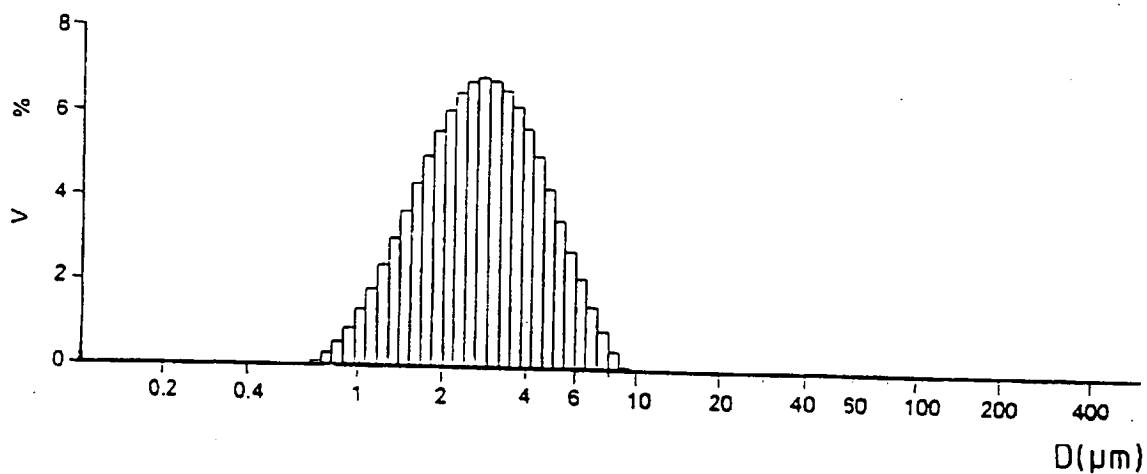
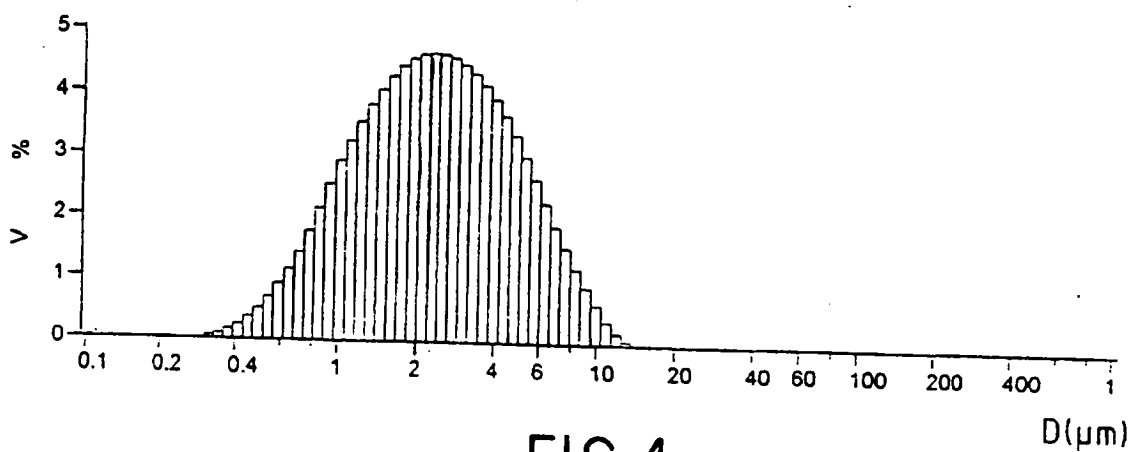
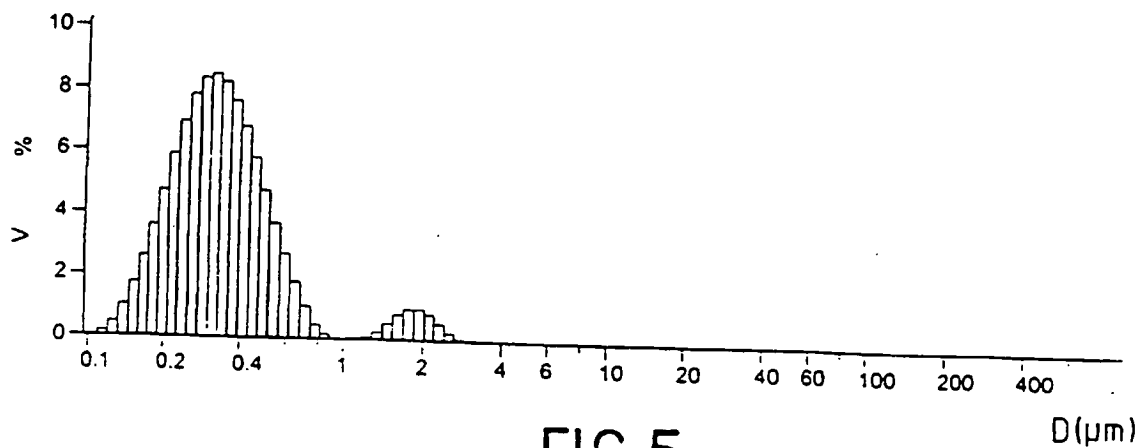


FIG.2



2/3

FIG. 3FIG. 4FIG. 5

3/3

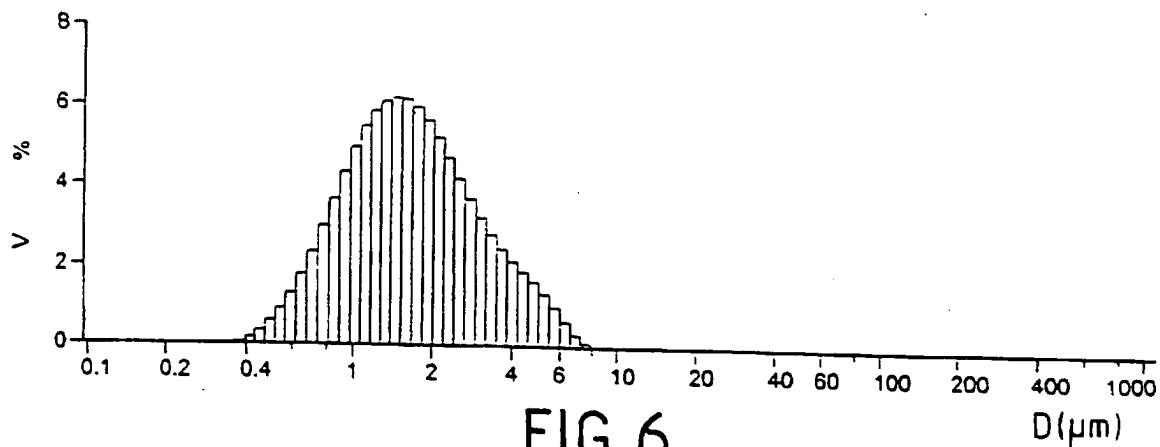


FIG. 6

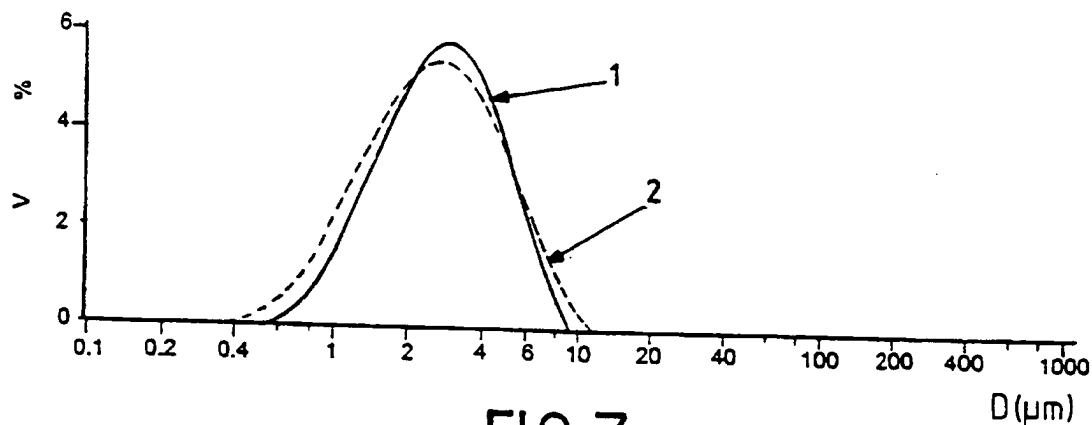


FIG. 7

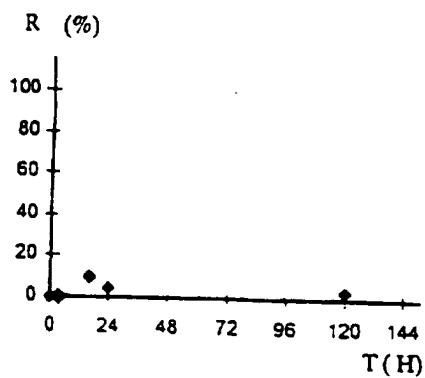


FIG. 9

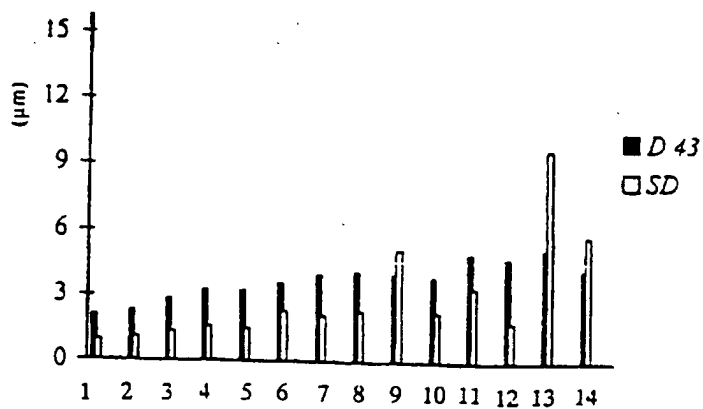


FIG. 8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/FR 97/00471

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A61K9/16 A61K9/51

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 976 968 A (STEINER) 11 December 1990 see the whole document ---	1-19
Y	GB 2 260 080 A (RHONE-POULENC RORER LIMITED) 7 April 1993 see page 1, line 1 - page 8, line 15 ---	1-19
P,Y	EP 0 734 720 A (FLAMEL TECHNOLOGIES) 2 October 1996 see the whole document -----	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 June 1997

Date of mailing of the international search report

08.07.1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Benz, K

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/FR 97/00471

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4976968 A	11-12-90	NONE	
GB 2260080 A	07-04-93	NONE	
EP 734720 A	02-10-96	FR 2732218 A	04-10-96
		AU 5337796 A	16-10-96
		WO 9629991 A	03-10-96

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem: Internationale No  
PCT/FR 97/00471

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 A61K9/16 A61K9/51

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 4 976 968 A (STEINER) 11 Décembre 1990 voir le document en entier ---	1-19
Y	GB 2 260 080 A (RHONE-POULENC RORER LIMITED) 7 Avril 1993 voir page 1, ligne 1 - page 8, ligne 15 ---	1-19
P,Y	EP 0 734 720 A (FLAMEL TECHNOLOGIES) 2 Octobre 1996 voir le document en entier -----	1-19

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 Juin 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08.07.1997

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Benz, K

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dema internationale No

PCT/FR 97/00471

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 4976968 A	11-12-90	AUCUN	
GB 2260080 A	07-04-93	AUCUN	
EP 734720 A	02-10-96	FR 2732218 A	04-10-96
		AU 5337796 A	16-10-96
		WO 9629991 A	03-10-96